

Nutzung nachwachsender Rohstoffe für die biotechnologische Produktion von Fumarsäure

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte

Dissertation

von Laslo Eidt
aus Ludwigshafen am Rhein

1. Referent:	Privatdozent Dr. Ulf Christian Prübe
2. Referentin:	Professorin Dr. Anett Schallmey
eingereicht am:	11.12.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am:	30.09.2020

Druckjahr 2021

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, vorab in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen

Eidt, L., A. Kuenz und U. Prüße (2018). "Biotechnologische Produktion von Fumarsäure: Prozessoptimierung und Kontrolle der Morphologie." *Chemie Ingenieur Technik* 90(9), 1272-1272.

Tagungsbeiträge

Eidt, L., A. Kuenz, U. Prüße (2018) "Utilization of apple pomace for biotechnological processes" (Vortrag), 14th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Gent, Belgien.

Eidt, L., A. Kuenz, U. Prüße (2018) "Biotechnologische Produktion von Fumarsäure: Prozessoptimierung und Kontrolle der Morphologie" (Poster), ProcessNet- und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1 Fumarsäure	3
2.1.1 Chemische und physikalische Eigenschaften	3
2.1.2 Anwendungsbereiche von Fumarsäure	4
2.2 Produktion von Fumarsäure	5
2.2.1 Petrochemische Fumarsäureproduktion	5
2.2.2 Biotechnologische Fumarsäureproduktion	6
2.2.2.1 Fumarsäure produzierende Mikroorganismen	6
2.2.2.2 Stoffwechselwege zur fermentativen Herstellung von Fumarsäure	8
2.3 Fumarsäureproduktion mit <i>Rhizopus</i> sp.	10
2.3.1 Einfluss der Sauerstoffkonzentration	11
2.3.2 Einfluss des pH-Wertes	12
2.3.3 Einfluss des Substrats	13
2.3.4 Einfluss von wachstumsrelevanten Medienbestandteilen	14
2.3.5 Einfluss von Spurenelementen	15
2.3.6 Morphologie von <i>Rhizopus</i> sp.	15
2.4 Agrarische Reststoffe	17
2.4.1 Lignocellulosehaltige Biomasse	17
2.4.2 Apfeltrester	18
2.5 Biokonversion auf Basis von agrarischen Reststoffen	20
2.5.1 Vorbehandlung	20
2.5.2 Enzymatische Hydrolyse	21
2.5.3 Prozessführung bei Biokonversionen	22

3. Material und Methoden	24
3.1 Kultivierung von <i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 1526	24
3.1.1 Medienzusammensetzung	24
3.1.1.1 Medium A	25
3.1.1.2 Medium B	26
3.1.1.3 Medium C	26
3.1.1.4 Optimiertes Medium C	27
3.1.2 Herstellung der Sporensuspension und Stammhaltung	27
3.1.3 Kultivierungen im Schüttelkolben	28
3.1.3.1 Kultivierung nach Ling und Ng (1989)	28
3.1.3.2 Referenzkultivierung mit direkter Sporeninokulation	28
3.1.3.3 Referenzkultivierung mit Vorkultur	28
3.1.3.4 Referenzkultivierung mit separater Produktion von Biomasse	29
3.1.4 Kultivierungen im 1 L-Reaktor	30
3.1.4.1 Reaktorkultivierung mit direkter Sporeninokulation	30
3.1.4.2 Reaktorkultivierung mit Vorkultur	31
3.1.5 Probenahme und Probenaufbereitung	31
3.2 Apfeltrester	33
3.2.1 Bestimmung der Zusammensetzung von Apfeltrester	33
3.2.2 Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit aus Apfeltrester	35
3.2.2.1 Zusätzliches Auspressen	35
3.2.2.2 Dreistufige Extraktion mit Wasser	35
3.2.2.3 Enzymatische Hydrolyse	36
3.2.3 Bilanzierungsmodell der verschiedenen Herstellungsstrategien	37
3.2.4 Aufreinigung der zuckerhaltigen Flüssigkeit zu Apfeltrester-Saft	38
3.2.5 Simultane Verzuckerung und Fermentation	38
3.2.6 Fermentation mit aufgereinigtem Apfeltrester-Saft	39
3.3 Analytische Methoden	40
3.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	40
3.3.2 Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischen Detektion	41
3.3.3 Ionenchromatographie	42
3.3.4 Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma	42
3.3.5 Bestimmung der Sporenkonzentration	43
3.3.6 Bestimmung der Biotrockenmasse	44
3.3.7 Fluoreszenzfärbung von Biomasse mit Propidiumiodid	44
3.3.8 Dokumentation der Morphologie und Mikroskopie	44

Inhaltsverzeichnis

3.3.9 Bestimmung der Cellulaseaktivität	45
3.3.10 Bestimmung von Glucoseäquivalenten mittels DNS-Reagenz	46
3.4 Datenauswertung.....	47
4. Ergebnisse und Diskussion	48
4.1 Produktion von Fumarsäure auf Basis von Glucose	48
4.1.1 Reproduktion der Kultivierung nach Ling und Ng (1989).....	48
4.1.2 Optimierung der Kultivierung nach Ling und Ng (1989)	51
4.1.2.1 Einfluss von Komplexmedienbestandteilen.....	51
4.1.2.2 Einfluss der Vorkultur und Art des Calciumcarbonats	53
4.1.2.3 Einfluss von Weinsäure	57
4.1.2.4 Einfluss der Sporenkonzentration	58
4.1.2.5 Einfluss durch die Charge und das Alter der Sporensuspension.....	59
4.1.2.6 Einfluss von Spurenelementen.....	60
4.1.2.7 Einfluss von Phosphat und Ammonium.....	63
4.1.2.8 Einfluss der Partikelgröße von Calciumcarbonat.....	65
4.1.2.9 Einfluss durch Zugabe von Calciumcarbonat	67
4.1.3 Referenzkultivierung mit direkter Sporeninokulation.....	69
4.1.3.1 Charakterisierung der Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526.....	70
4.1.3.2 Einfluss der initialen Glucosekonzentration	73
4.1.4 Referenzkultivierung mit Vorkultur.....	76
4.1.4.1 Etablierung einer Vorkulturstrategie.....	76
4.1.4.2 Charakterisierung der Morphologie	78
4.1.4.3 Bestimmung der Biomassekonzentration während der Kultivierung	79
4.1.4.4 Löslichkeit von Fumarsäure während der Kultivierung	80
4.1.4.5 Einfluss der Konzentration von Calciumcarbonat	81
4.1.5 Produktion von hohen Endkonzentrationen an Fumarsäure.....	84
4.1.5.1 Einfluss durch Zugabe von Glucose	84
4.1.5.2 Einfluss durch hohe initiale Glucosekonzentrationen.....	85
4.1.5.3 Einfluss durch Zugabe von Glucose und Ammonium	87
4.1.6 Produktion von Fumarsäure in 1 L-Reaktoren.....	92
4.1.6.1 Kultivierung mit direkter Sporeninokulation im 1 L-Reaktor	92
4.1.6.2 Kultivierung mit Vorkultur im 1 L-Reaktor	96
4.1.7 Referenzkultivierung mit separater Produktion von Biomasse.....	99
4.1.7.1 Bestimmung der Biomassekonzentration während der Kultivierung	100
4.1.7.2 Produktion von Fumarsäure unter wachstumslimitierenden Bedingungen	101
4.1.8 Zusammenfassung und Vergleich mit der Literatur.....	103

4.2 Produktion von Fumarsäure auf Basis von alternativen Zuckern	107
4.2.1 Kultivierung mit direkter Sporeninokulation	107
4.2.2 Kultivierung mit Vorkultur	109
4.2.2.1 Einsatz von alternativen Monosacchariden.....	109
4.2.2.2 Einsatz von synthetischen Zuckermischungen	111
4.2.2.3 Vergleich mit der Kultivierung auf Basis von Glucose	113
4.2.3 Kultivierung mit separater Biomasseproduktion.....	115
4.3 Produktion von Fumarsäure auf Basis von Apfeltrester	118
4.3.1 Charakterisierung von Apfeltrester	118
4.3.1.1 Restfeuchte, Asche- und Stickstoffgehalt von Apfeltrester	118
4.3.1.2 Fraktionierung von Apfeltrester.....	119
4.3.1.3 Anteil und Zusammensetzung der Zucker in Apfeltrester	120
4.3.2 Simultane Verzuckerung und Fermentation von Apfeltrester.....	123
4.3.3 Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfeltrester	127
4.3.3.1 Zusätzliches Auspressen von Apfeltrester	127
4.3.3.2 Dreistufige Extraktion mit Wasser.....	130
4.3.3.3 Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester	134
4.3.3.4 Kombinierte Prozessführung der einzelnen Herstellungsstrategien	143
4.3.4 Aufreinigung der zuckerhaltigen Flüssigkeit zu Apfeltrester-Saft.....	150
4.3.4.1 Fällung von Trübstoffen mit Calciumcarbonat.....	151
4.3.4.2 Aufreinigung mittels Kationentauscher	152
4.3.5 Kultivierung mit Vorkultur und Apfeltrester-Saft.....	154
4.3.6 Kultivierung mit separater Biomasseproduktion und Apfeltrester-Saft.....	157
4.3.6.1 Kultivierung mit Apfeltrester-Saft und einer Zuckerkonzentration von 90 g/L ..	157
4.3.6.2 Kultivierung mit Apfeltrester-Saft und einer Zuckerkonzentration von 150 g/L	160
4.3.7 Zusammenfassung und Einordnung der Kultivierungsergebnisse	162
4.3.8 Prozessüberblick: Fumarsäure aus Apfeltrester	164
4.3.9 Vergleich mit der Literatur.....	166
5. Zusammenfassung und Ausblick	168

Inhaltsverzeichnis

Literaturverzeichnis	171
Abkürzungsverzeichnis und Formelzeichen	181
Abbildungsverzeichnis	183
Tabellenverzeichnis	190
Anhang	192
Danksagung.....	196

1. Einleitung und Zielsetzung

Der fossile Rohstoff Erdöl zählt weltweit zu den wichtigsten Energieträgern und ist zudem der bedeutendste Ausgangsstoff für die chemische Industrie. Allerdings ist aufgrund der endlichen Verfügbarkeit dieses Rohstoffs, des Fortschreitens des Klimawandels, eines zunehmenden Umweltbewusstseins und einer steigenden Nachfrage ein Umdenken erforderlich, hin zu einer Nutzung von erneuerbaren und nachwachsenden Ressourcen.

Vor allem in der Polymerindustrie werden erdölbasierte Plattformchemikalien zur Herstellung von unterschiedlichen Kunststoffen und Harzen verwendet. In diesem Zusammenhang bieten biotechnologische Verfahren eine vielversprechende Alternative, um die benötigten Ausgangsstoffe nachhaltig und umweltfreundlich zu produzieren. Hierbei werden in der Biotechnologie üblicherweise reine Zucker wie Glucose oder Saccharose als Ausgangssubstrat eingesetzt, die aus Zuckerrüben, Zuckerrohr, Mais, Kartoffeln oder Getreide gewonnen werden. Da für den Anbau dieser Substratquellen landwirtschaftliche Anbauflächen benötigt werden, besteht in der stofflichen Nutzung dieser Rohstoffe eine direkte Konkurrenz zur Lebensmittel- und Futtermittelindustrie. Um diesen Nachteil zu umgehen, können alternativ auch agrarische Reststoffe genutzt werden, die in der Landwirtschaft und deren weiterverarbeitenden Industrie als CO₂-neutrale, kostengünstige Nebenprodukte anfallen. Ein Beispiel für diese Art an Biomasse ist Apfeltrester, der bei der Herstellung von Apfelsaft als fester Pressrückstand zurückbleibt und weltweit in großen Mengen anfällt.

Fumarsäure ist eine vielseitig einsetzbare organische Säure, die in der Polymerchemie hauptsächlich zur Herstellung von Polyesterharzen und Alkydharzen verwendet wird. Aktuell wird sie ausschließlich petrochemisch, auf Basis von Erdöl, hergestellt. Fumarsäure wurde allerdings im Jahr 2004 vom Energieministerium der Vereinigten Staaten als eine der Top 12 Plattformchemikalien ausgewählt, die das Potenzial aufweisen, mittels Biomasse hergestellt werden zu können (Werpy und Petersen, 2004). Zur biotechnologischen Produktion von Fumarsäure werden vor allem Pilze der Gattung *Rhizopus* verwendet. Die höchsten Produktendkonzentrationen, Ausbeuten und Produktivitäten konnten hierbei mit dem Produktionsstamm *R. arrhizus* NRRL 1526 erzielt werden (Rhodes et al., 1962; Kenealy et al., 1986; Ling und Ng, 1989). Bemerkenswerterweise wurden diese Ergebnisse in den 1960er - 1980er Jahren erzielt und konnten seitdem nicht in publizierten Forschungsarbeiten reproduziert bzw. übertroffen werden (Roa Engel et al., 2008; Xu et al., 2012). Als mögliche Ursache hierfür kann die sehr komplexe und herausfordernde Kontrolle der Wachstumsform des Pilzes während der Fermentation angeführt werden. So werden abhängig von der Morphologie stark abweichende Fermentationsergebnisse erzielt. Hinsichtlich eines effektiven und somit möglichst wirtschaftlichen

Einleitung und Zielsetzung

Produktionsprozesses von Fumarsäure kommt einer gezielten Kontrolle der Morphologie eine Schlüsselrolle zu.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines möglichst effektiven Fermentationsprozesses zur biotechnologischen Herstellung von Fumarsäure mit dem Produktionsstamm *R. arrhizus* NRRL 1526. Hierzu soll zunächst auf Basis des Substrats Glucose eine gezielte Medienoptimierung durchgeführt und dabei der Einfluss von möglichen Prozessanpassungen auf die Morphologie des Pilzes untersucht werden. Auf Basis des optimierten Mediums sollen anschließend verschiedene Fermentations-strategien entwickelt und diese anhand von spezifischen Vor- und Nachteilen verglichen werden. Unter anderem soll hierbei die maximal mögliche Endkonzentration an Fumarsäure identifiziert werden, die mittels einer integrierten Zugabe von zusätzlichem Substrat möglich ist. Anhand der Kultivierungsstrategie mit dem größten Potenzial soll außerdem der Einfluss eines Scale-ups vom Schüttelkolbenmaßstab in einen aktiv begasten Bioreaktor untersucht werden.

Weiterhin soll anstelle von Glucose der agrarische Reststoff Apfeltrester als Substratquelle verwendet werden. Vorbereitend sollen hierzu die in Apfeltrester enthaltenen Zucker charakterisiert und eine unter wirtschaftlichen Aspekten vielversprechende Methode zur Bereitstellung dieser Zucker entwickelt werden. Um eine möglichst effektive Biokonversion von Apfeltrester zu Fumarsäure zu erzielen, sollen die auf Basis von Glucose gewonnen Erkenntnisse und die dabei entwickelten Fermentationsstrategien auf das Substrat Apfeltrester übertragen werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Fumarsäure

Fumarsäure (FA, englisch - fumaric acid) ist eine natürlich vorkommende organische Säure, die erstmals im Jahr 1832 von F. L. Winckler aus der namensgebenden Pflanze *Fumaria officinalis* (Gewöhnlicher Erdrauch, Familie: *Papaveraceae*) isoliert wurde (Roa Engel et al., 2008). Fumarsäure spielt in vielen Organismen als Intermediat des Citratzyklus oder als Metabolit des Harnstoffzyklus eine entscheidende Rolle (Shambaugh, 1977; Xu et al., 2012).

2.1.1 Chemische und physikalische Eigenschaften

Die organische Säure Fumarsäure, auch als *trans*-Butendisäure bezeichnet, ist eine ungesättigte Dicarbonsäure, welche zwei endständige Carboxyl-Gruppen und eine *trans*-Doppelbindung in α , β -Position besitzt (Das et al., 2016a). Die entsprechende Strukturformel des C₄-Moleküls ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

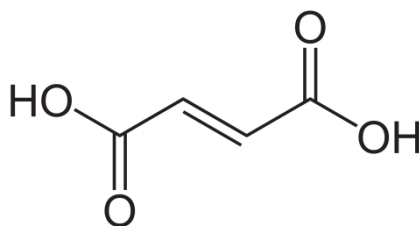


Abbildung 2.1: Strukturformel von Fumarsäure.

In Reinform liegt Fumarsäure als weißes, kristallines Pulver vor, das geruchslos ist. Die Salze der Fumarsäure werden als Fumarate bezeichnet (Yang et al., 2011). Weitere wichtige Eigenschaften von Fumarsäure sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Hervorzuheben ist dabei vor allem die geringe Löslichkeit von Fumarsäure in Wasser (6,3 g/L, 25 °C), die durch hohe intermolekulare Wechselwirkungen, aufgrund der vorliegenden *trans*-Stellung der beiden Carboxyl-Gruppen, begründet werden kann. So weist das *cis*-Isomer der Fumarsäure, die Maleinsäure, mit 441 g/L (25 °C) eine deutlich gesteigerte Löslichkeit in Wasser auf (Felthouse et al., 2000).

Tabelle 2.1: Chemische und physikalische Eigenschaften von Fumarsäure (Zhang et al., 2013).

Summenformel	$C_4H_4O_4$
Molare Masse	116,1 g/mol
Aggregatzustand	fest
Dichte	1,635 g/cm ³
Schmelzpunkt	287 °C
Siedepunkt	290 °C
pK _s -Werte	3,03 und 4,44
Löslichkeit in Wasser	6,3 g/L (25 °C)

2.1.2 Anwendungsbereiche von Fumarsäure

Aufgrund der hohen Anzahl an funktionellen Gruppen findet Fumarsäure als bedeutende Chemikalie in verschiedenen Bereichen der chemischen Industrie Anwendung. So wird Fumarsäure als Comonomer in der Polymerindustrie zur Herstellung von ungesättigten Polyesterharzen und Alkydharzen eingesetzt. Bei den zugrundeliegenden Polymerisations- und Veresterungsreaktionen steht Fumarsäure allerdings in direkter Konkurrenz zu Maleinsäureanhydrid, das aufgrund eines ca. 10 % günstigeren Preises aktuell in der Polymerindustrie bevorzugt wird (Roa Engel et al., 2008). Als vorteilhaft kann allerdings angeführt werden, dass Fumarsäure, im Gegensatz zu Maleinsäureanhydrid, nicht gesundheitsgefährdend ist. Durch die Präsenz einer intermolekularen C=C Doppelbindung ermöglicht der Einsatz von Fumarsäure eine erhöhte Festigkeit, Resistenz gegenüber chemischer Korrosion sowie Langlebigkeit der resultierenden Polymerstruktur (Tsao et al., 1999; Das et al., 2016a). Neben der Herstellung von synthetischen Harzen wird Fumarsäure auch in der Papier- und Zellstoffindustrie als saurer Zusatzstoff (Tackifier) eingesetzt (Roa Engel et al., 2008).

Ein weiteres bedeutendes Anwendungsgebiet von Fumarsäure liegt in der Lebensmittelindustrie. Als Lebensmittelzusatzstoff (E 297) dient sie hierbei primär als Säuerungsmittel bzw. Geschmacksverstärker. Da Fumarsäure eine relativ starke Säure ist, mit einer hohen Pufferkapazität im pH-Bereich von 3, wird zudem das Wachstum von Mikroorganismen unterbunden und somit die Haltbarkeit von Lebensmitteln verbessert. Außerdem wird Fumarsäure als Zwischenprodukt zur Herstellung weiterer organischen Säuren wie z.B. L-Asparaginsäure und L-Äpfelsäure verwendet („Fumaric acid market size, share | Global industry analysis report, 2020“, 2018; Goldberg et al., 2006).

In der Futtermittelindustrie wird Fumarsäure zudem als antibakterieller Zusatzstoff eingesetzt. So konnte beispielsweise bei Rindern eine Reduktion des Methanausstoßes um bis zu 70 % nachgewiesen werden. Da Nutztiere für ca. 14 % der weltweit auftretenden Methanemissionen verantwortlich sind, besteht hier ein vielversprechender Ansatz, um die klimaschädliche Emission von Treibhausgasen zu reduzieren (McGinn et al., 2004; Roa Engel et al., 2008).

In der Medizin wird Fumarsäure und deren Ester als Wirkstoff gegen die Hautkrankheit Schuppenflechte (Psoriasis) sowie bei Multipler Sklerose (Encephalomyelitis disseminata) verwendet, einer chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankung des Nervensystems. In diesem Zusammenhang wurde

Dimethylfumarat im Jahr 2014 offiziell als Medikament gegen Multiple Sklerose zugelassen (Weißert, 2014; Das et al., 2016a).

2.2 Produktion von Fumarsäure

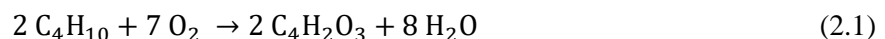
Fumarsäure kann sowohl chemisch als auch biotechnologisch hergestellt werden. Bezüglich der biotechnologischen Produktion ist anzumerken, dass in den 1940er Jahren von dem US-Pharmakonzern Pfizer eine Anlage betrieben wurde, die eine fermentative Produktion von jährlich ca. 4.000 Tonnen ermöglichte. Unter wirtschaftlichen Aspekten konnte sich dieser biotechnologische Ansatz zur Herstellung von Fumarsäure allerdings nicht gegenüber der chemischen Synthese durchsetzen. Daher wird heutzutage Fumarsäure ausschließlich chemisch, auf Basis von Erdöl, hergestellt (Goldberg et al., 2006).

Die weltweite Produktion an Fumarsäure betrug im Jahr 2012 ca. 225.200 Tonnen, mit einem prognostizierten Anstieg auf ca. 350.000 Tonnen/Jahr bis 2020. Je nach Reinheitsgrad schwankt der Preis von Fumarsäure dabei zwischen 1870 - 2650 US\$/Tonne (Hajduk et al., 2014; „Fumaric acid market size, share | Global industry analysis report, 2020“, 2018).

2.2.1 Petrochemische Fumarsäureproduktion

Als Ausgangsstoff für die chemische Synthese von Fumarsäure werden in der Industrie die fossilen Rohstoffe Benzol, n-Butan oder eine Mischung aus n-Butan und n-Buten verwendet. Am Beispiel von n-Butan ist im Folgenden der Herstellungsprozess beschrieben, der sich in drei Reaktionsschritte unterteilen lässt (Roa Engel et al., 2008; Yang et al., 2011).

In einem ersten Reaktionsschritt wird n-Butan zunächst katalytisch zu Maleinsäureanhydrid oxidiert:



Diese Reaktion findet üblicherweise in Festbettreaktoren statt, in denen der entsprechende Katalysator (Vanadium- /Phosphoroxide) eingesetzt ist. Mithilfe organischer Lösemittel werden anschließend mehr als 98 % des Maleinsäureanhydrids aus dem Reaktionsgas absorbiert und durch fraktionelle Destillation vom Lösemittel abgetrennt (Lohbeck et al., 2000).

Auf Grundlage des aufgereinigten Maleinsäureanhydrids wird in einem zweiten Schritt durch Hydrolyse Maleinsäure gewonnen:



Abschließend wird Maleinsäure mittels thermischer oder katalytischer *cis-trans*-Isomerisierung zu Fumarsäure umgesetzt. Bezogen auf die katalytische Konversion werden üblicherweise Mineralsäuren, Peroxy-Verbindungen mit Bromiden bzw. Bromaten oder schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Thioharnstoff als Katalysator verwendet. Prinzipiell ist auch eine enzymatische Isomerisierung mittels einer thermisch stabilen Malat-*cis-trans*-Isomerase möglich. Als Vorteil kann hierbei angeführt werden, dass bei der entsprechenden Reaktion keine Nebenprodukte gebildet werden

und somit höhere Ausbeuten von bis zu 95 % erreicht werden (Ichikawa et al., 2003). Die abschließende Aufreinigung der Fumarsäure kann z.B. über Kristallisation, Waschen und Trocknung erfolgen.

Die hier beschriebene chemische Synthese von Fumarsäure zeichnet sich vor allem durch hohe Ausbeuten und Produktivitäten aus. Als weitere Vorteile können die simple Aufreinigung des Endprodukts sowie die langjährige Erfahrung und der hohe Entwicklungsstand des Herstellungsprozesses angeführt werden. Als nachteilig können dagegen gesundheitsrelevante Aspekte der teilweise toxischen Katalysatoren sowie steigende Preise der endlichen Ausgangskemikalien eingestuft werden. Vor allem aufgrund letzterem besteht ein wachsendes Interesse die Chemikalie Fumarsäure auch mittels Fermentationen in großtechnischem Maßstab herstellen zu können (Roa Engel et al., 2008; Zhang et al., 2013).

2.2.2 Biotechnologische Fumarsäureproduktion

Um mit dem petrochemischen Produktionsverfahren konkurrieren zu können, muss eine biotechnologische Fumarsäureproduktion wirtschaftlich rentabel sein. Hierzu wird ein mikrobieller Produktionsstamm benötigt, der hohe Ausbeuten, Produktivitäten und Produktendkonzentrationen an Fumarsäure ermöglicht. Weitere wichtige Anforderungen sind eine leichte Handhabbarkeit des verwendeten Mikroorganismus sowie ein möglichst breites Substratspektrum. All diese Faktoren beeinflussen die fermentativen Herstellungskosten von Fumarsäure und bestimmen somit maßgeblich die Wirtschaftlichkeit des Prozesses.

2.2.2.1 Fumarsäure produzierende Mikroorganismen

Zur biotechnologischen Produktion von Fumarsäure eignen sich vor allem filamentös wachsende Pilze. In diesem Zusammenhang untersuchten Foster und Waksman (1939) insgesamt 41 Pilzstämmen aus verschiedenen Gattungen der Ordnung Mucorales bezüglich ihres Produktionsverhaltens. Dabei konnten die Gattungen *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella* und *Circinella* als vielversprechende Fumarsäureproduzenten identifiziert werden. Bezogen auf das Erzielen von hohen Ausbeuten und Produktivitäten an Fumarsäure zeigten vor allem *Rhizopus* sp. ein hohes Potenzial auf. Diese Feststellung spiegelt sich auch in einer Vielzahl an Patenten wieder, die sich mit der fermentativen Produktion von Fumarsäure beschäftigen und primär Pilze der Gattung *Rhizopus* verwenden (Waksman, 1943; Lubowitz und La, 1958; Goldberg und Stieglitz, 1986; Ling und Ng, 1989). Hervorzuheben ist hierbei das Patent des US-Unternehmens DuPont aus dem Jahr 1989, das einen optimierten Fermentationsprozess mit dem Stamm *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 beschreibt. Dabei konnte durch eine gezielte Regulierung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Kultivierungsansatz eine sehr effektive Produktion von Fumarsäure und weiterer organischen Säuren erzielt werden (Ling und Ng, 1989). Eine Übersicht von verschiedenen Publikationen, die sich mit der fermentativen Fumarsäureproduktion beschäftigen, ist in Tabelle 2.2 gegeben. Aufgeführt werden dabei der verwendete Produktionsstamm, das Kultivierungssystem sowie der bei der entsprechenden Kultivierung erzielte Endtiter, Ausbeute und Produktivität. Bei allen Fermentationen diente Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle.

Tabelle 2.2: Überblick über die fermentative Produktion von Fumarsäure mittels *Rhizopus* sp. auf Basis von Glucose.

Stamm	System	Endtiter [g/L]	Ausbeute [g/g]	Produktivität [g/(L·h)]	Referenz
<i>R. nigricans</i> 45	SK	14,7	0,50	-	Foster und Waksman, 1939
	SK	20,0	0,66	0,25	Romano et al., 1967
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	STR	103,0	0,79	1,43	Rhodes et al., 1962
	STR	73,3	0,72	0,50	Gangl et al., 1990
	SK	30,1	0,66	0,21	Papadaki et al., 2017
<i>R. arrhizus</i> NRRL 1526	SK	97,7	0,81	1,02	Kenealy et al., 1986
	STR	135,3	1,04	1,77	Ling und Ng, 1989
	STR	52,0	0,36	0,52	Riscaldati et al., 2002
	STR	35,4	0,44	0,49	Zhou et al., 2011
	SK	67,3	0,84	0,74	Das et al., 2016b
<i>R. oryzae</i> ATCC 20344	STR	65,0	0,65	0,90	Cao et al., 1996
	SK	39,3	0,45	-	Zhou et al., 2000
	STR	30,2	0,28	0,18	Roa Engel et al., 2011
	SK	50,2	0,72	0,33	Zhang et al., 2015
<i>R. oryzae</i> ZJU11 *	SK	57,4	0,68	0,48	Huang et al., 2010
<i>R. oryzae</i> FM 19 *	STR	56,5	0,71	0,67	Wang et al., 2013

SK - Schüttelkolben, STR - Rührreaktor, * - genetisch modifizierter Organismus

2.2.2.2 Stoffwechselwege zur fermentativen Herstellung von Fumarsäure

Fumarsäure bzw. Fumarat wird in Pilzen der Gattung *Rhizopus* über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege gebildet. So kann die Akkumulation von Fumarsäure einerseits über den oxidativen Citratzyklus erfolgen. Andererseits ist auch eine Bildung über die reduktive Carboxylierung möglich, die auch als $C_3 + C_1$ Mechanismus bezeichnet wird (Roa Engel et al., 2008; Xu et al., 2012). Anhand des Substrats Glucose werden im Folgenden beide Stoffwechselwege beschrieben und in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

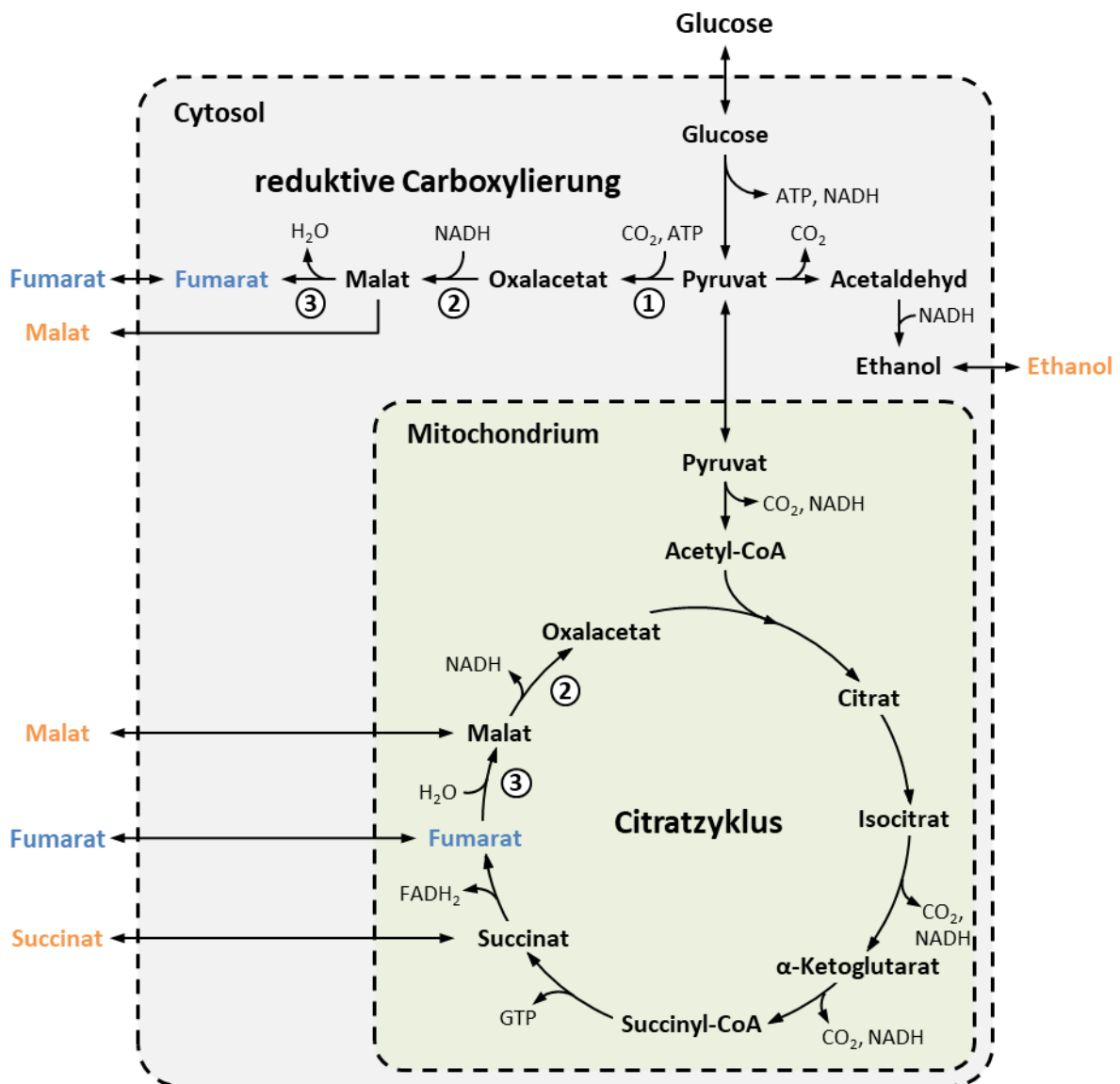


Abbildung 2.2: Produktion von Fumarsäure in *Rhizopus* sp. mittels oxidativem Citratzyklus und reduktiver Carboxylierung (modifiziert nach Roa Engel et al., 2008; Xu et al., 2012); 1 - Pyruvat-Carboxylase, 2 - Malat-Dehydrogenase, 3 - Fumarase.

Der oxidativ ablaufende Citratzyklus ist in den Mitochondrien lokalisiert und dient hauptsächlich der Energiegewinnung bzw. der Bildung von Intermediaten für den Aufbau von Biomasse. Dabei wird Pyruvat, das im Cytoplasma mittels Glykolyse aus Glucose gebildet wird, in den Citratzyklus eingeschleust und über mehrere Intermediate zu CO_2 oxidiert. Die dabei gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 dienen der Energiegewinnung in Form von ATP, die in der oxidativen Atmungskette erfolgt. Unter ausreichender Verfügbarkeit von Sauerstoff ermöglicht die Kombination aus Glykolyse und Citratzyklus die Bereitstellung von insgesamt $32 \text{ mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ (Munk et al., 2008). Bei mangelnder Sauerstoffversorgung sind *Rhizopus* sp. auch in der Lage die deutlich ineffektivere alkoholische Gärung durchzuführen (Xu et al., 2012). Dabei wird Pyruvat zu Ethanol reduziert und insgesamt lediglich $2 \text{ mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ gebildet. Als Intermediat des Citratzyklus ist die Akkumulation von Fumarat über diesen Stoffwechselweg prinzipiell denkbar. Jedoch wird in mehreren Publikationen die Produktion von Fumarsäure primär mit der reduktiven Carboxylierung in Verbindung gebracht (Kenealy et al., 1986; Roa Engel et al., 2008; Yang et al., 2011).

Der zweite mögliche Stoffwechselweg zur Bildung von Fumarat ist die im Cytosol ablaufende reduktive Carboxylierung. Hierbei wird zunächst Pyruvat, unter Fixierung von CO_2 und Verbrauch von ATP, zu Oxalacetat reduziert. Das bei dieser Reaktion beteiligte Enzym ist die Pyruvat-Carboxylase. Anschließend katalysiert die Malat-Dehydrogenase, unter Verwendung von NADH, die Reaktion von Oxalacetat zu Malat. Dieses wird mittels des Enzyms Fumarase zu Fumarat umgesetzt (Xu et al., 2012). Bezüglich des Schlüsselenzyms Fumarase konnten in *R. oryzae* zwei unterschiedliche Fumarase-Isoenzyme identifiziert werden, die entweder in den Mitochondrien oder im Cytoplasma lokalisiert sind (Goldberg et al., 2006). Dabei katalysiert die mitochondriale Fumarase die im Citratzyklus ablaufende Reaktion von Fumarat zu Malat. Die cytoplasmatische Fumarase katalysiert dagegen primär die Reaktion in entgegengesetzter Richtung, also die Bildung von Fumarat aus Malat (Yogev et al., 2011). Bezüglich dieser Reaktion konnte eine erhöhte Enzymaktivität während der Produktion von Fumarsäure festgestellt werden (Peleg et al., 1989). Ergänzend hierzu konnte eine weitere Steigerung der cytoplasmatischen Fumarase-Aktivität durch eine Limitierung der Stickstoffkonzentration im Kultivierungsansatz erzielt werden (Ding et al., 2011). Außerdem wurde bei einer intrazellulären Fumarsäurekonzentration von über 2 mM eine Inhibierung der Rückreaktion zu Malat nachgewiesen (Song et al., 2011). Alle drei Beobachtungen sind somit deutliche Anzeichen, dass eine kontinuierliche Akkumulation von Fumarsäure über die reduktive Carboxylierung erfolgt.

Bezogen auf die maximal mögliche Ausbeute an Fumarsäure ergeben sich je nach Stoffwechselweg zwei unterschiedliche theoretische Ausbeuten. So ermöglicht die Bildung von Fumarsäure über den Citratzyklus eine theoretische Ausbeute von maximal $1 \text{ mol}_{\text{FA}}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ bzw. $0,64 \text{ g}_{\text{FA}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$. Mittels reduktiver Carboxylierung ist dagegen eine maximale Ausbeute von $2 \text{ mol}_{\text{FA}}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ bzw. $1,29 \text{ g}_{\text{FA}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ möglich. In der Praxis ist allerdings mit einer geringeren Ausbeute zu rechnen, da ein ausschließliches Ablaufen der reduktiven Carboxylierung, aufgrund des Verbrauchs von ATP bei der CO_2 -Fixierung, zu einem Energiedefizit führen würde. Somit ist bei der fermentativen Produktion von Fumarsäure auch der oxidative Citratzyklus zur Aufrechterhaltung der Energiebilanz aktiv (Kenealy et al., 1986; Zhang et al., 2013).

2.3 Fumarsäureproduktion mit *Rhizopus* sp.

Die Mitglieder der Gattung *Rhizopus* gehören phylogenetisch betrachtet zur Ordnung der Mucorales in der Klasse der saprotrophen Zygomyceten (Jochpilze). In natürlicher Form kommen sie ubiquitär im Boden oder auf abgestorbenen Pflanzen vor. Zur Verstoffwechslung der dort vorliegenden Kohlenstoffquellen besitzen *Rhizopus* sp. verschiedene Hydrolasen wie z.B. Cellulasen, Xylanasen, Pektinasen und Amylasen, die ihnen eine Nutzung von unterschiedlichen strukturell gebundenen Zuckern ermöglichen (Yang et al. 2011). Diese Fähigkeit macht sie besonders für biotechnologische Produktionsprozesse auf Basis nachwachsender Reststoffe interessant. Bezogen auf das Produktionsverhalten können *Rhizopus* sp. in zwei Gruppen unterteilt werden. Dies sind zum einen die Gruppe der Fumarsäureproduzenten und zum anderen Stämme, die primär Milchsäure produzieren (Abe et al., 2007). Da eine taxonomische Einstufung des jeweiligen Stammes sowohl auf Grundlage von morphologischen Charakteristika oder nach dem Produktionsverhalten an Säuren erfolgen kann, ist die Taxonomie von *Rhizopus* sp. nicht vollständig systematisch. So existiert beispielsweise, je nach Stammdatenbank, für den in dieser Arbeit verwendeten Stamm *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 auch die synonymen Speziesbezeichnungen *R. oryzae* und *R. delemar* (NRRL Culture Collection - *Rhizopus oryzae* NRRL 1526, 2019; DZMS - *Rhizopus delemar* DSM 905, 2019).

Die fermentative Produktion von Fumarsäure mittels *Rhizopus* sp. unterteilt sich formal in drei Prozessstufen (s. Abbildung 2.3). In der ersten Stufe, der Sporenproduktion, werden auf festem Agarmedium Sporen des verwendeten Produktionsstammes produziert. Mit diesen Sporen wird in der anschließenden Wachstumsphase ein stickstoffreiches Flüssigmedium angeimpft. Die zweite Prozessstufe dient dabei dem Auskeimen der Sporen und der Bildung von ausreichend Biomasse. Die eigentliche Produktion von Fumarsäure erfolgt in der dritten Prozessstufe, der Produktionsphase, welche mittels der zuvor gebildeten Biomasse inokuliert wird. Dabei wird ein Kultivierungsmedium verwendet, das ein weiteres Biomassewachstum des Produktionsstamms limitiert. Dadurch wird das zur Verfügung gestellte Substrat primär zur Akkumulation von Fumarsäure verwendet und dient nur in geringem Maße dem Erhaltungsstoffwechsel und der Bildung von weiterer Biomasse (Yang et al., 2011; Xu et al., 2012). Zur Limitierung des Wachstums ist üblicherweise die Stickstoffkonzentration des Produktionsmediums, im Vergleich zum Medium der Wachstumsphase, deutlich reduziert. Prinzipiell ist eine Wachstumslimitierung auch über die Phosphatkonzentration im Produktionsmedium möglich (Riscaldati et al., 2002).



Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Fumarsäureproduktion mit *Rhizopus* sp.

Hinsichtlich einer möglichst effektiven Produktion an Fumarsäure sind zahlreiche Einflussfaktoren bei der Kultivierung von *Rhizopus* sp. zu beachten. Dies betrifft zum einen allgemeine Prozessparameter wie die Auswahl des Kultivierungssystems und die Einstellung der entsprechenden Kultivierungsparameter (z.B. Temperatur, pH-Wert und die Durchmischung des Systems). Dabei kommt der

Sauerstoffversorgung des Pilzes eine Schlüsselrolle zu, die unter anderem von der Rheologie des Kultivierungssystems abhängt. Zum anderen haben die eingesetzten Medienbestandteile, sowohl während der Wachstumsphase als auch in der Produktionsphase, einen großen Einfluss auf die Wachstumsform des Pilzes und das Produktionsverhalten. Die verwendeten Medienbestandteile können formal in das Substrat (Kohlenstoff- und Energiequelle), wachstumsrelevante Bestandteile (Stickstoff-, Phosphatquelle und Komplexmedienbestandteile) und Spurenelemente unterteilt werden (Xu et al., 2012).

In den folgenden Kapiteln befindet sich hierzu eine ausführliche Beschreibung der Bedeutung und Einflussnahme dieser Prozessparameter auf das Kultivierungssystem sowie eine Aufführung der bei *Rhizopus* sp. auftretenden Morphologieformen.

2.3.1 Einfluss der Sauerstoffkonzentration

Rhizopus sp. sind aerobe Organismen, die während der Fermentation eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr benötigen. Bei einer zu geringen Sauerstoffversorgung bzw. schwankenden Konzentrationen des Gelöstsauerstoffs wird die Produktion von Fumarsäure negativ beeinflusst und die Bildung von Nebenprodukten wie z.B. Ethanol begünstigt. Dagegen führt ein zu hoher Eintrag an Sauerstoff zu einer Stimulation des Citratzyklus und begünstigt somit eine übermäßige Bildung von Biomasse und den Energieverbrauch (Xu et al. 2012). In diesem Zusammenhang untersuchten Ling und Ng (1989) den Einfluss von verschiedenen Konzentrationen des Gelöstsauerstoffs während einer Reaktorkultivierung mit *R. arrhizus* NRRL 1526. Dabei konnte bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 80 % die effektivste Produktion von Fumarsäure erzielt werden. Konzentrationen unterhalb sowie oberhalb dieses Wertes führten dagegen zu einem Rückgang der Fumarsäureproduktion. Ergänzend hierzu entwickelte Fu et al. (2010) eine zweistufige Prozessführung des Gelöstsauerstoffs. Bei der entsprechenden Fermentation wurde nach 18 h Kultivierungsdauer die Konzentration an gelöstem Sauerstoff von anfänglich 80 % auf 30 % reduziert. Dies resultierte, trotz einer Zunahme der Akkumulation von Ethanol, in einer gesteigerten Produktion an Fumarsäure, die mit einer Begünstigung der anaerob ablaufenden reduktiven Carboxylierung begründet werden kann (Zhang et al., 2013).

Neben der absoluten Konzentration an Gelöstsauerstoff kommt der Morphologie der vorliegenden Biomasse eine entscheidende Rolle zu. In Abhängigkeit von der Wachstumsform des Pilzes treten hierbei unterschiedliche Effekte des Sauerstofftransports zu den Zellen auf. So können bei der Ausbildung von kompakten Wachstumsformen, trotz einer ausreichenden Sauerstoffkonzentration im Medium, sauerstofflimitierte Bereiche im Inneren der Biomasse entstehen. Um der dort vorliegenden Limitierung des Sauerstofftransports vorzubeugen, ist eine gezielte Kontrolle der Morphologie erforderlich (Fu et al., 2010).

2.3.2 Einfluss des pH-Wertes

Während der Kultivierung von *Rhizopus* sp. wird durch die Bildung von Fumarsäure der pH-Wert des Mediums herabgesenkt. Bei einem zu geringen pH-Wert diffundiert die undissoziierte Form der Fumarsäure durch die Plasmamembran zurück in die Zellen und senkt dort den intrazellulären pH-Wert. Dies resultiert in einer Inhibierung des Biomassewachstums und verhindert eine weitere Akkumulation von Fumarsäure (Roa Engel et al., 2008). Um dieser Selbstinhibierung entgegenzuwirken, ist eine Regulierung des pH-Werts während der Fermentation erforderlich. Der optimale pH-Wert liegt dabei im Bereich von 5 - 6 (Zhou et al., 2002; Roa Engel et al., 2011; Zhang et al., 2013).

Zur Regulierung des pH-Wertes wird bei der fermentativen Produktion von Fumarsäure üblicherweise Calciumcarbonat (CaCO_3) als Neutralisationsmittel verwendet. Da CaCO_3 in Wasser eine sehr geringe Löslichkeit aufweist, wird es zu Beginn der Fermentation als Feststoff im Medium vorgelegt. Während der Kultivierung reagiert der gelöste Teil des CaCO_3 mit der akkumulierten Fumarsäure zu Calciumfumarat, CO_2 und Wasser. Durch das Nachlösen von weiterem CaCO_3 entsteht dabei die pH-Pufferung des Kultivierungssystems. Als vorteilhaft kann bei der Verwendung von CaCO_3 die leichte Handhabung angeführt werden, da eine online-Regulierung des pH-Wertes nicht erforderlich ist. Außerdem entsteht bei der Reaktion CO_2 , welches in der reduktiven Carboxylierung zur Bildung von Fumarsäure verwendet werden kann (Das et al., 2016b). Nachteilig ist dagegen die geringe Löslichkeitsgrenze des gebildeten Calciumfumarats (21 g/L bei 30 °C, Gangl et al., 1990). Akkumulierte Konzentrationen oberhalb der Löslichkeitsgrenze liegen im Kultivierungsansatz als Feststoff vor und erhöhen somit die Viskosität. Dies kann zu einer erhöhten Agglomeration der Biomasse führen und resultiert in einer Reduktion der Sauerstoff- bzw. Substratversorgung. Zusätzlich werden zur Rückgewinnung von Fumarsäure aus dem Kultivierungsansatz Säuren (z.B. Schwefelsäure oder Salzsäure) benötigt. Bei dem entsprechenden Aufreinigungsschritt fällt Calciumsulfat bzw. Calciumchlorid als Abfallprodukt an (Xu et al., 2012).

Aufgrund dieser Nachteile wurden verschiedene alternative Neutralisationsmittel wie Na_2CO_3 , NaHCO_3 und $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ untersucht (Gangl et al., 1990; Riscaldati et al., 2000; Liu et al., 2015a). Da diese Basen im Gegensatz zu CaCO_3 gut wasserlöslich sind, ist eine online-Regulierung über einen Feed möglich. Vorteilhaft ist dabei vor allem die höhere Löslichkeit der gebildeten Fumarate (Natriumfumarat bzw. Ammoniumfumarat), die während der Kultivierung nicht ausfallen. Somit kann eine zusätzliche Viskositätserhöhung vermieden werden, das Produkt leichter von der im Kultivierungsansatz vorliegenden Biomasse separiert und die Biomasse gegebenenfalls wieder-verwendet werden (Gangl et al., 1990; Zhou et al., 2002).

Jedoch werden mit CaCO_3 , im Vergleich zu diesen alternativen Neutralisationsmitteln, bessere Kultivierungsergebnisse bezüglich der Produktion von Fumarsäure erzielt. Daher wird zur fermentativen Produktion von Fumarsäure primär CaCO_3 zur Regulierung des pH-Wertes verwendet (Roa Engel et al., 2008; Yang et al., 2011).

2.3.3 Einfluss des Substrats

Bei der biotechnologischen Produktion von Fumarsäure entsteht ein Großteil der Herstellungskosten durch die Bereitstellung des Substrats. Daher ist es für einen effizienten Herstellungsprozess wichtig, eine möglichst günstige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden und somit die Substratkosten zu minimieren (Åkerberg und Zacchi, 2000; Zhang et al., 2007). Neben dem vergleichsweise teuren Substrat Glucose wurden deshalb in zahlreichen Studien der Einsatz von alternativen Mono- bzw. Polysacchariden untersucht (Xu et al., 2012). Ergänzend hierzu liefert die Verwendung von agrarischen Reststoffen als Substrat einen vielversprechenden Ansatz um die Substratkosten zu senken. In Tabelle 2.3 sind verschiedene Veröffentlichungen zusammenfassend dargestellt, die unterschiedliche Substratquellen zur Herstellung von Fumarsäure verwenden.

Tabelle 2.3: Überblick über die fermentative Produktion von Fumarsäure mittels *Rhizopus* sp. auf Basis alternativer Kohlenstoffquellen.

Substrat	Stamm	Endtiter [g/L]	Ausbeute [g/g]	Produktivität [g/(L·h)]	Referenz
Xylose	<i>Rhizopus arrhizus</i> TKK 204-1-1a	16,4	0,24	0,07	Kautola und Linko, 1989
	<i>Rhizopus arrhizus</i> RH-7-13	45,3	0,57	0,47	Liu et al., 2015
Glucose/Xylose	<i>Rhizopus arrhizus</i> RH-7-13	43,7	0,55	0,52	Liu et al., 2017
Glucose/Fructose	<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582	30,8	0,98	0,22	Papadaki et al., 2018
Maniok Bagasse	<i>Rhizopus formosa</i> MUCL 28422	21,3	-	0,34	Carta et al., 1999
Weizenstroh	<i>Rhizopus oryzae</i> ME-F12 *	27,8	0,35	0,33	Xu et al., 2010
Maiskolben	<i>Rhizopus oryzae</i> WHT5 *	49,1	0,45	0,41	Wu et al., 2018
Kartoffelstärke	<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 1526	44,0	0,59	0,31	Moresi et al., 1991
Lebensmittel-abfälle	<i>Rhizopus arrhizus</i> RH-07-13	32,7	-	0,34	Liu et al., 2016
Apfelfrester	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 1526	25,2	-	0,35	Das et al., 2015a

* - genetisch modifizierter Organismus

Hinsichtlich einer Verwendung von agrarischen Reststoffen als Substrat ist zu beachten, dass in der entsprechenden Biomasse neben Glucose noch weitere Monosaccharide enthalten sind. Bei lignocellulosehaltiger Biomasse, wie beispielsweise Laubhölzer oder Stroh, ist dies hauptsächlich die Pentose Xylose. Das mittels *Rhizopus* sp. eine Verstoffwechslung von Xylose bzw. einer Mischung von Glucose und Xylose prinzipiell möglich ist, konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Kautola und Linko, 1989; Liu et al., 2015; Liu et al., 2017). Auch der Einsatz von realen lignocellulosehaltigen Reststoffen, wie Weizenstroh oder Reste von Maiskolben, ermöglicht eine fermentative Produktion von Fumarsäure (Xu et al., 2010; Wu et al., 2018). Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die

dort enthaltenen Zucker strukturell, in Form von Polysacchariden, gebunden sind. Vor der eigentlichen Fermentation ist daher eine Vorbehandlung der entsprechenden Biomasse notwendig. Die Monomerisierung der in Cellulose und Hemicellulose enthaltenen Zucker kann dabei über physikalische, chemische und enzymatische Hydrolyseverfahren erfolgen (Ji et al., 2012).

Als weitere kostengünstige Substratquelle eignet sich auch Stärke, die aus glykosidisch verknüpfter Glucose besteht, zur biotechnologischen Produktion von Fumarsäure (Moresi et al., 1991). Analog zu reiner Glucose steht allerdings auch Stärke in direkter Konkurrenz zur Lebensmittelindustrie. Das bedeutet agrarische Anbauflächen, die für die Herstellung des Substrats zur Fumarsäureproduktion benötigt werden, können nicht mehr zur Lebensmittel- bzw. Futtermittelherstellung genutzt werden.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde ebenfalls der Einsatz von alternativen Substratquellen untersucht, die nicht in direkter Konkurrenz zur Lebensmittelindustrie stehen. Beispiele hierfür sind Lebensmittelabfälle oder Reststoffe, die bei der Herstellung von Apfelsaft anfallen (Das et al., 2015a; Liu et al., 2016). Neben lignocellulosehaltigen Bestandteilen sind in diesen Substraten außerdem nicht strukturell gebundene, wasserlösliche Saccharide wie Glucose, Fructose und Saccharose enthalten, die von *Rhizopus* sp. verstoffwechselt werden können (Bulut et al., 2004; Papadaki et al., 2018).

Ein Vergleich der alternativen Substratquellen mit Glucose zeigt allerdings auf, dass in bisherigen Studien die besten Kultivierungsergebnisse mit der Kohlenstoffquelle Glucose erzielt wurden (vgl. Kapitel 2.2.2.1). Mögliche Ursachen für die geringe Effektivität der Fumarsäureproduktion sind dabei geringere Verstoffwechselungsraten von alternativen Zuckern und eine erforderliche Umstellung des Stoffwechselwegs bei der Verwendung von mehreren Sacchariden (Xu et al., 2012; Das et al., 2016a).

2.3.4 Einfluss von wachstumsrelevanten Medienbestandteilen

Für den Aufbau und die Funktionalität der Biomasse sind die Medienbestandteile Stickstoff und Phosphat essentiell. Sie dienen dabei der Biosynthese von bedeutenden Makromolekülen wie DNA, RNA, Proteinen und Enzymen (Munk et al., 2008). Der Einsatz dieser beiden Komponenten kann im Medium entweder in anorganischer Form (z.B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und KH_2PO_4) oder in organischer Form, durch Zugabe von Komplexmedienbestandteilen (Maisquellwasser oder Hefeextrakt) erfolgen. In diesem Zusammenhang stellten Ling und Ng (1989) fest, dass eine Zugabe von organisch gebundenem Stickstoff (Hefeextrakt) eher das Wachstum von *Rhizopus* sp. fördert, während der Einsatz einer anorganischen Stickstoffquelle die Akkumulation von Fumarsäure begünstigt (Das et al., 2016a).

Neben der Art der Stickstoff- und Phosphatquelle kommt der eingesetzten Konzentration im Produktionsmedium eine große Bedeutung zu. So wird in der Produktionsphase üblicherweise das Biomassewachstum mittels Stickstofflimitierung begrenzt und folglich die Verstoffwechselung der Kohlenstoffquelle zu Fumarsäure gefördert. Zur Beschreibung der dort vorliegenden Kultivierungsbedingungen wird das Verhältnis von Kohlenstoff- zu Stickstoffquelle (C-/N-Verhältnis) verwendet. Bei der fermentativen Produktion von Fumarsäure werden in der Literatur C-/N-Verhältnisse von 120 - 250 als ideal beschrieben (Rhodes et al., 1959; Magnuson und Lasure, 2004; Zhang et al., 2013).

2.3.5 Einfluss von Spurenelementen

Als Spurenelemente werden Metalle bezeichnet die dem Medium in sehr geringen Konzentrationen beigesetzt werden. Sie fungieren dabei als wichtige Bestandteile von Enzymen bzw. Cofaktoren und dienen beispielsweise der Stabilisierung von Zellmembranen oder Proteinen. Spurenelemente sind somit essentiell für das Wachstum und die Funktionalität von Zellen (Munk et al., 2008).

Bei Kultivierungen mit *Rhizopus* sp. werden drei Metallionen (Mg^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+}) im Medium der Wachstums- und Produktionsphase eingesetzt. Die Notwendigkeit einer Zugabe dieser drei Spurenelemente für das zelluläre Wachstum konnte beispielsweise von Zhou et al. (2000) nachgewiesen werden. In dieser Studie verhinderte der Verzicht einer Zugabe von Mg^{2+} ein Auskeimen der Sporen des Stammes *R. oryzae*. Neben der metabolischen Funktion beeinflusst die Konzentration dieser drei Spurenelemente auch maßgeblich die Wachstumsform des Pilzes (Waksman, 1943; Papagianni, 2004; Liao et al. 2007). Da die Morphologie in direktem Zusammenhang mit den Produktionseigenschaften an Fumarsäure steht, ist eine gezielte Einflussnahme durch eine optimal gewählte Konzentration an Spurenelementen von großer Bedeutung.

2.3.6 Morphologie von *Rhizopus* sp.

Die Morphologie von *Rhizopus* sp. kann in drei verschiedene Wachstumsformen unterteilt werden: Klumpen, Pellets oder Mycel. Das Produktionsverhalten an Fumarsäure unterscheidet sich dabei signifikant in Abhängigkeit von der entsprechenden Wachstumsform des Pilzes (Roa Engel et al., 2008). Welche Form der Morphologie dabei innerhalb des Kultivierungssystems ausgebildet wird, hängt maßgeblich von den zuvor beschriebenen Prozessparametern ab. Allerdings können diese Einflussfaktoren nicht alleinstehend betrachtet werden. Vielmehr resultiert die Morphologie aus einem komplexen Zusammenspiel aller Kultivierungsparameter. Dieser Sachverhalt schränkt nicht nur die Vergleichbarkeit verschiedener Forschungsstudien untereinander ein, sondern erschwert außerdem die Identifizierung von allgemeingültigen Gesetzmäßigkeiten bei einer gezielten Kontrolle der Morphologie (Papagianni, 2004; Das et al., 2016a).

Bei der Ausbildung von Klumpen-Morphologie lagert sich die submers vorliegende Biomasse zu großen, stark agglomerierten Bereichen zusammen. Aufgrund der dichten Zusammenlagerung der Biomasse und eines ungünstigen Oberflächen-/Volumen-Verhältnisses kommt es diffusionsbedingt zu sauerstofflimitierenden Bedingungen innerhalb des Klumpens. Dies resultiert in einer geringen Akkumulation von Fumarsäure und begünstigt die Bildung von Ethanol (Xu et al., 2012). Findet die entsprechende Kultivierung in einem Bioreaktor statt, entstehen Klumpen primär an apparativen Einbauten wie der Begasungsfritte oder eingesetzten Elektroden. Eine gezielte Prozesssteuerung ist dabei durch das adhärierte Bewachsen der Reaktoreinbauten nicht mehr möglich. Aufgrund dieser Nachteile ist die Ausbildung von Klumpen-Morphologie ungeeignet für die fermentative Produktion von Fumarsäure (Byrne et al., 1989; Kosakei et al., 1997).

Lagert sich die ausgebildete Biomasse von *Rhizopus* sp. dagegen in kleinen sphärischen Agglomeraten zusammen, wird diese Wachstumsform als Pellet-Morphologie bezeichnet. Die Entstehung eines Pellets kann dabei auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden. Ist eine einzelne Spore der

Ursprung für ein Pellet, wird dies als Nicht-Koagulation bezeichnet. Agglomerieren dagegen die ausgebildeten Hyphen von zwei oder mehreren Sporen zu einem Pellet, bezeichnet man diesen Vorgang als Koagulation (Metz und Kossen, 1977). Im Gegensatz zu großen Klumpen ermöglicht die Ausbildung von Pellets eine gesteigerte Substrat- bzw. Sauerstoffversorgung der Biomasse. Da das Innere eines Pellets allerdings einen kompakten Biomassekern aufweist, können bei zu großen Pellets trotzdem stofftransportlimitierende Effekte auftreten, die das Produktionsverhalten negativ beeinflussen. Als ideal für fumarsäureproduzierenden *Rhizopus* sp. wird ein Pelletdurchmesser von < 1 mm beschrieben (Zhou et al., 2011; Zhang et al., 2013). Ein weiterer Vorteil bei der Fermentation mit Pellet-Morphologie ist die geringe Viskosität des Kultivierungsansatzes. Dies resultiert in einem verbesserten Stofftransport innerhalb der Flüssigphase und führt zu einem reduzierten Energieeintrag bei der Durchmischung und Begasung des Kultivierungsansatzes (Xu et al., 2012).

Die dritte mögliche Wachstumsform von *Rhizopus* sp. ist die Mycel-Morphologie. Das filamentöse Wachstum ermöglicht dabei eine verbesserte Versorgung der Biomasse mit dem Substrat und Sauerstoff. Nachteilig ist dagegen die erhöhte Viskosität des Kultivierungsansatzes aufgrund der nur leicht agglomeriert vorliegenden Biomasse. Dies erfordert einen erhöhten Energieaufwand bei der Durchmischung und Begasung des Kultivierungssystems (Xu et al., 2012). Außerdem wird der Mycel-Morphologie unter nicht optimalen Kultivierungsbedingungen eine erhöhte Tendenz zugeschrieben, an Oberflächen bzw. Reaktoreinbauten zu adhären und diese zu bewachsen (Ilica et al., 2018).

Bezüglich des Potenzials Fumarsäure zu akkumulieren, existieren verschiedene Veröffentlichungen, die entweder mit Mycel- oder Pellet-Morphologie eine effektivere Produktion von Fumarsäure erzielten. So konnten beispielsweise in Rhodes et al. (1962) und Papadaki et al. (2017) mittels Mycel-Morphologie eine bessere Fumarsäureproduktion realisiert werden als mit Pellets. Zu entgegengesetzten Ergebnissen kamen Studien von Liao et al. (2007) und Zhou et al. (2011). Die widersprüchlichen Ergebnisse dieser Publikationen zeigen somit auf, dass eine allgemeingültige Präferenz einer bestimmten Wachstumsform nicht möglich ist. Vielmehr ist es daher sinnvoll, bei der Entwicklung eines effektiven Kultivierungssystems zur Produktion von Fumarsäure, spezifisch auftretende Probleme und Optimierungspotenziale im Kontext der Morphologie zu erfassen und gegebenenfalls durch eine gezielte Kontrolle der Morphologie entgegenzuwirken.

2.4 Agrarische Reststoffe

Der Begriff agrarische Reststoffe bezeichnet eine Gruppe von pflanzlicher Biomasse, die in der Landwirtschaft oder deren weiterverarbeitenden Industrie anfällt. Beispiele für agrarische Reststoffe, die in Deutschland in großen Mengen auftreten, sind organische Materialien wie Stroh und Kaff, die beim Anbau von Getreide anfallen oder Biomasse, die beispielsweise bei der Herstellung von Fruchtsäften als fester Reststoff zurückbleibt (Schieber et al., 2003; Zeller et al., 2012). Je nach Art des Reststoffs kann sich die spezifische Zusammensetzung der Biomasse dabei stark voneinander unterscheiden. Im Allgemeinen bestehen agrarische Reststoffe aus strukturgebenden Polymeren wie Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Zusätzlich können weitere Bestandteile wie Fette, Proteine, anorganische Mineralien und wasserlösliche Fruchtzucker in der Biomasse vorhanden sein (Olsson et al., 2005). Hinsichtlich einer biotechnologischen Nutzung ist vorteilhaft, dass diese Reststoffe als kostengünstiges Substrat in großen Mengen zur Verfügung stehen und im Gegensatz zu Stärke oder reiner Glucose keine direkte Konkurrenz zur Lebensmittelindustrie aufweisen.

2.4.1 Lignocellulosehaltige Biomasse

Als Lignocellulose werden strukturgebende Bestandteile der Zellwand bezeichnet, die in Cellulose, Hemicellulose und Lignin unterteilt werden. Untereinander bilden die einzelnen Bestandteile verknüpfte Komplexe aus, die maßgeblich an der Stabilität des entsprechenden Pflanzenteils beteiligt sind. Ein weiteres strukturgebendes Polymer ist Pektin, das je nach Art und Teil der Pflanze in unterschiedlichen Anteilen in der Zellwand vorkommt (Willats et al., 2001; Lynd et al., 2002).

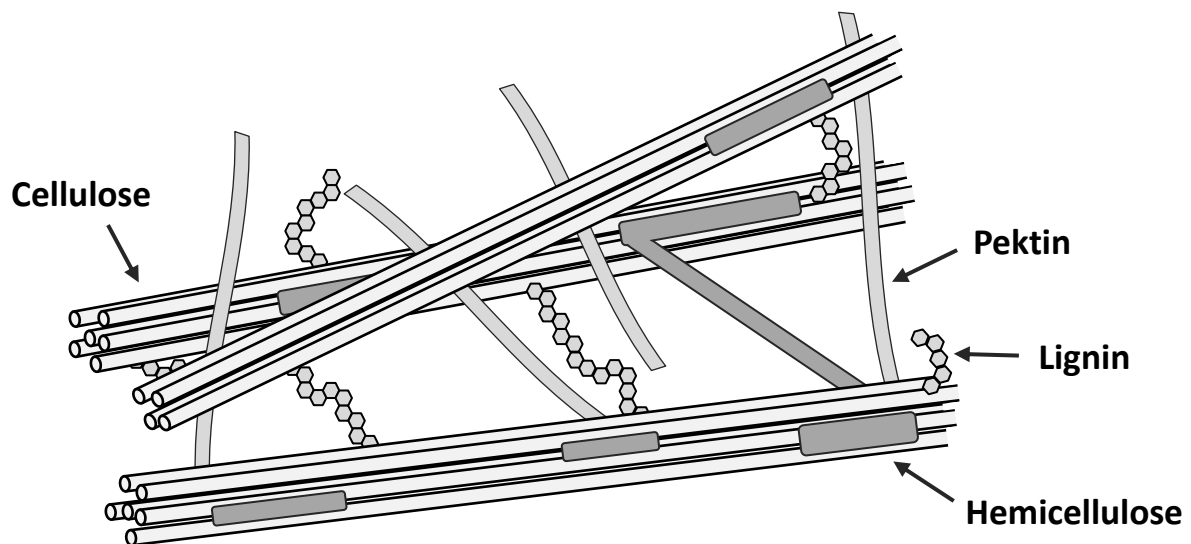


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau von lignocellulosehaltiger Biomasse, bestehend aus Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin (modifiziert nach Loix et al., 2017).

Den Hauptbestandteil von lignocellulosehaltiger Biomasse bildet Cellulose. Dabei handelt es sich um ein lineares, unverzweigtes Polysaccharid, das aus Glucose-Monomeren besteht, die über β -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (Albersheim et al., 2010). Über inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte lagern sich die Celluloseketten zu Mikrofibrillen zusammen, die wiederum unelastische Cellulosefibrillen ausbilden.

Die dichte und kristalline Packung dieser Strukturen weist eine sehr hohe Stabilität auf und kann nur schwer in ihre einzelnen Monomere zerlegt werden (Knill und Kennedy, 1998). In regelmäßigen Abständen wird die kristalline Struktur der Cellulosefibrillen durch amorphe, ungeordnete Bereiche unterbrochen, die eine geringere Dichte aufweisen (Dadi et al., 2006).

Im Gegensatz zu Cellulose handelt es sich bei Hemicellulose um ein heterogenes Polysaccharid, das aufgrund seiner verzweigten Struktur in der Zellwand ausschließlich in amorpher Form vorliegt. Je nach Pflanzenart weist Hemicellulose unterschiedliche Anteile der strukturell verknüpften Pentosen Xylose, Arabinose und der Hexosen Galactose, Mannose und Glucose auf (Popa und Spiridon, 1998). Die Hauptkette von Hemicellulose bilden dabei β -1,4-verknüpfte Xyloseeinheiten. Innerhalb dieser Kette entstehen durch die Ausbildung von α -1,2- bzw. α -1,3-Bindungen unterschiedlich lange Seitenketten, die die weiteren Saccharide und Bindungen zu Acetat enthalten (Jäger und Büchs, 2012). Aufgrund der heterogenen Struktur und der geringeren Kristallinität weist Hemicellulose eine geringere thermische und chemische Stabilität auf (McKendry, 2002).

Zwei weitere bedeutende Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden sind Lignin und Pektin. Durch ihre Präsenz wird die Druckfestigkeit der Zellen erhöht und somit die Stabilität der Pflanze gewährleistet. Außerdem sind beide Strukturen bei der Regulierung des Wasserhaushalts beteiligt und beim Schutz vor oxidativem Stress (Willats et al., 2001; Hendriks und Zeeman, 2009). Die Struktur von Lignin besteht aus drei unterschiedlichen phenolischen Hauptmonomeren (Cumaryl-, Coniferyl- und Sinaphylalkohol) die unregelmäßig über Ether- und Ester-Bindungen miteinander verknüpft sind (Sette et al., 2011). Pektin besteht dagegen hauptsächlich aus α -1,4-verknüpften Galacturonsäure-einheiten. In periodischen Abständen kann diese Kette durch den Einbau des Monosaccharids Rhamnose unterbrochen werden. Auch eine Verzweigung durch oligomere Saccharidketten ist möglich (Caffall und Mohnen, 2009). Hinsichtlich einer biotechnologischen Nutzung der in Cellulose und Hemicellulose enthaltenen Zucker ist die Präsenz von Lignin und Pektin nachteilhaft. So erschweren beide Strukturen, aufgrund ihres komplexen drei-dimensionalen Aufbaus und teilweise kovalenten Bindungen zu Cellulose bzw. Hemicellulose, die Hydrolyse der in Lignocellulose gebundenen Polysacchariden (Dadi et al., 2006).

2.4.2 Apfeltrester

Bei Apfeltrester handelt es sich um Pressrückstände, die bei der industriellen Herstellung von Apfelsaft in großen Mengen anfallen. In Abhängigkeit von der dabei verwendeten Presse bleiben ca. 25 - 30 % des ursprünglichen Apfels als Trester zurück (Wang und Thomas, 1989; Vendruscolo et al., 2008). Neben festen Bestandteilen wie Schale, Fruchtfleisch, Kerngehäuse, Kerne und Stiele weist Apfeltrester eine hohe Restfeuchte von ca. 70 - 80 % auf, in der noch signifikante Mengen an wasserlöslichen Zuckern (Glucose, Fructose und Saccharose) enthalten sein können (Paganini et al., 2005). Die absolute Konzentration an nicht strukturell gebundenen, wasserlöslichen Zuckern hängt dabei maßgeblich von der Prozessstrategie bei der Pressung ab. Werden beispielsweise mechanisch zerkleinerte Äpfel zur Herstellung von Direktsaft verwendet, erfolgt die Separierung des Apfelsafts üblicherweise mittels einer einfachen hydraulischen Pressung, ohne eine weitere Behandlung der Pressrückstände. Bei der Flüssigkeit, die im Apfeltrester zurückbleibt, handelt es sich somit um nicht abgepressten Apfelsaft, der eine hohe Zuckerkonzentration aufweist. Bei der Herstellung von Apfelsaftkonzentrat werden dagegen

nach der ersten Pressung, durch Zugabe von Wasser und erneutem Pressen, weitere wasserlösliche Zucker extrahiert und vom Apfeltrester separiert. Apfeltrester, der bei der Herstellung von Apfelsaftkonzentrat anfällt, weist somit geringere wasserlösliche Zuckeranteile auf (Schobinger et al., 2001).

Bezogen auf den deutschen Markt dominiert die Herstellung von Apfeldirektsaft. Die jährliche Menge an Apfeltrester beläuft sich je nach Erntesaison auf ca. 0,2 Mio. Tonnen/Jahr (Heitlinger, 2015). Innerhalb von Europa (ca. 1,1 Mio. Tonne/Jahr) liegt Deutschland damit auf dem vierten Platz, wobei in Polen die größten Mengen an Apfeltrester anfallen (Krautgartner et al., 2016). Global betrachtet fallen jährlich ca. 8,5 Mio. Tonnen Apfeltrester an. China bildet hierbei mit einem Anteil von über 80 % das bedeutendste Land beim Anbau von Äpfeln und deren Weiterverarbeitung (Wadhwa und Bakshi, 2013).

Aufgrund der großen Mengen an jährlich auftretendem Apfeltrester kommt einer weiteren Nutzung dieses agrarischen Reststoffs eine große Bedeutung zu. In Deutschland werden ca. 50 % des anfallenden Apfeltresters zur Gewinnung von Pektin genutzt, das in der Lebensmittelindustrie als Geliermittel verwendet wird. 25 % des Apfeltresters werden in Biogasanlagen als Substrat für eine weitere energetische Nutzung eingesetzt. Die restlichen 25 % werden in Deutschland zur Wildtierfütterung und landwirtschaftlichen Fütterung verwendet (Heitlinger, 2015). Einschränkend ist hierbei zu erwähnen, dass Apfeltrester, aufgrund der hohen Restfeuchte und der dort frei vorliegenden Zucker, nur eine sehr geringe Haltbarkeit aufweist. So verdirbt ungekühlter Apfeltrester durch mikrobielles Wachstum innerhalb von wenigen Tagen (Vendruscolo et al., 2008). Im Gegensatz zu Deutschland werden weltweit betrachtet große Mengen an Apfeltrester in Deponien kompostiert und somit weder stofflich noch energetisch genutzt (Gassara et al., 2011; Magyar et al., 2016).

Hinsichtlich einer Verwendung als Ausgangssubstrat für biotechnologische Prozesse bietet Apfeltrester zwei mögliche Kohlenstoffquellen. Dies sind zum einen die bereits erwähnten wasserlöslichen Zucker, die während der Pressung nicht vom Trester separiert werden, dort als Mono- bzw. Disaccharide vorliegen und somit direkt verstoffwechselt werden können. Zum anderen enthält Apfeltrester strukturell gebundene Polysaccharide der Cellulose und Hemicellulose, die bezüglich einer mikrobiellen Nutzung noch monomerisiert werden müssen.

2.5 Biokonversion auf Basis von agrarischen Reststoffen

Der Begriff Biokonversion beschreibt die Umsetzung einer organischen Substanz in ein stofflich nutzbares Produkt durch den Einsatz von Biokatalysatoren wie Enzyme und Mikroorganismen (Canilha et al., 2012). Bei der Verwendung von agrarischen Reststoffen als Ausgangssubstrat unterteilt sich die Biokonversion in drei übergeordnete Prozessschritte: Vorbehandlung der Biomasse, enzymatische Hydrolyse und mikrobielle Fermentation (Menon und Rao, 2012). Jeder dieser Prozessschritt weist spezifische Zielsetzungen und Herausforderungen auf, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

2.5.1 Vorbehandlung

Das Ziel der Vorbehandlung ist es, die komplexe Struktur der verwendeten Biomasse aufzubrechen und somit die Zugänglichkeit von strukturell gebundenen Polysacchariden in der darauf folgenden enzymatischen Hydrolyse zu verbessern (Taherzadeh und Karimi, 2008; Kim et al., 2016). Hierzu stehen je nach Art und Zusammensetzung der lignocellulosehaltigen Biomasse unterschiedliche Vorbehandlungsmethoden zur Verfügung. Sie können formal in physikalische Methoden (z.B. mechanisches Zerkleinern oder thermische Aufschlussverfahren) und chemische Vorbehandlungsmethoden, bei denen üblicherweise Säuren oder Basen zum Einsatz kommen, unterteilt werden. Gegebenenfalls ist auch die Verwendung von kombinierten physikalisch-chemischen Vorbehandlungsmethoden zielführend. Eine ausführliche Übersicht von unterschiedlichen Verfahren der Vorbehandlung von Lignocellulose und deren Auswirkungen auf die Struktur der Biomasse sind in Alvira et al. (2010) und Bornscheuer et al. (2014) gegeben.

Prinzipiell müssen bei der Wahl der Vorbehandlungsmethode verschiedene Einflussfaktoren berücksichtigt werden. So beeinflusst das Vorbehandlungsverfahren und die dabei gewählten Reaktionsparameter maßgeblich die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses. Weiter können zu harsch gewählte Reaktionsbedingungen zu einer frühzeitigen Monomerisierung der in Cellulose und vor allem Hemicellulose gebundenen Polysaccharide führen, die gegebenenfalls ausgetragen werden (Wyman et al., 2005). Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die ungewollte Weiterreaktion der freigesetzten Monosaccharide zu Furanderivaten (5-Hydroxymethylfurfural oder Furfural) und aliphatischen Säuren (Ameisen-, Essig- oder Lävulinsäure). In der späteren Fermentation können diese Stoffe als potentiell toxische Inhibitoren wirken und somit die Effektivität der Biokonversion negativ beeinträchtigen (Alvira et al., 2010; Jönsson et al., 2013).

Ob eine Vorbehandlung durchgeführt wird und wenn ja, welche Methode dabei angewendet wird, ist stark abhängig von der verwendeten Biomasse und des eingesetzten Biokatalysators. Allgemeingültige Aussagen sind in diesem Zusammenhang nicht möglich. Vielmehr müssen spezifische Vor- und Nachteile beim Einsatz einer bestimmten Vorbehandlungsmethode gegeneinander abgewogen und im Kontext des gesamten Prozesses betrachtet werden (Hendriks und Zeeman, 2009).

2.5.2 Enzymatische Hydrolyse

Hinsichtlich einer effektiven fermentativen Verstoffwechslung der Kohlenstoffquelle ist das Vorliegen des Substrats in Form von Monosacchariden erforderlich. Daher werden strukturell gebundene Zucker der Cellulose und Hemicellulose enzymatisch hydrolysiert und somit monomerisiert. Die dabei beteiligten Enzyme werden entsprechend ihrer spezifischen Aktivität in verschiedene Klassen unterteilt. So erfolgt die Spaltung von Hemicellulose in die entsprechenden Monosaccharide durch Hemicellulasen wie z.B. Xylanasen. Die Monomerisierung von Cellulose wird durch Enzyme der Klasse Cellulasen katalysiert. Nach Wyman et al. (2005) können Cellulase in insgesamt drei Gruppen unterteilt werden, die bei der Reaktion von Cellulose zu Glucose beteiligt sind:

- Endoglucanasen (1,4- β -D-glucan-4-Glucanohydrolasen) hydrolysieren Cellulose zufällig innerhalb der amorphen Bereiche der Polysaccharidkette. Dabei entstehen Oligosaccharide mit unterschiedlichen Kettenlängen.
- Exoglucanasen (1,4- β -D-glucan-4-Cellobiohydrolasen) spalten dagegen in amorphen und kristallinen Bereichen der Cellulose endständig einzelne Cellobiose-Einheiten (Disaccharid der Glucose) ab. Je nach Kettenende der Cellulose, reduziert oder nicht-reduziertes Ende, wird dabei zwischen Exoglucanasen I und Exoglucanasen II unterschieden.
- β -Glucosidasen (β -D-glucoside-Glucohydrolasen) katalysieren primär die Hydrolyse der abgespalteten Cellobiose zu Glucose.

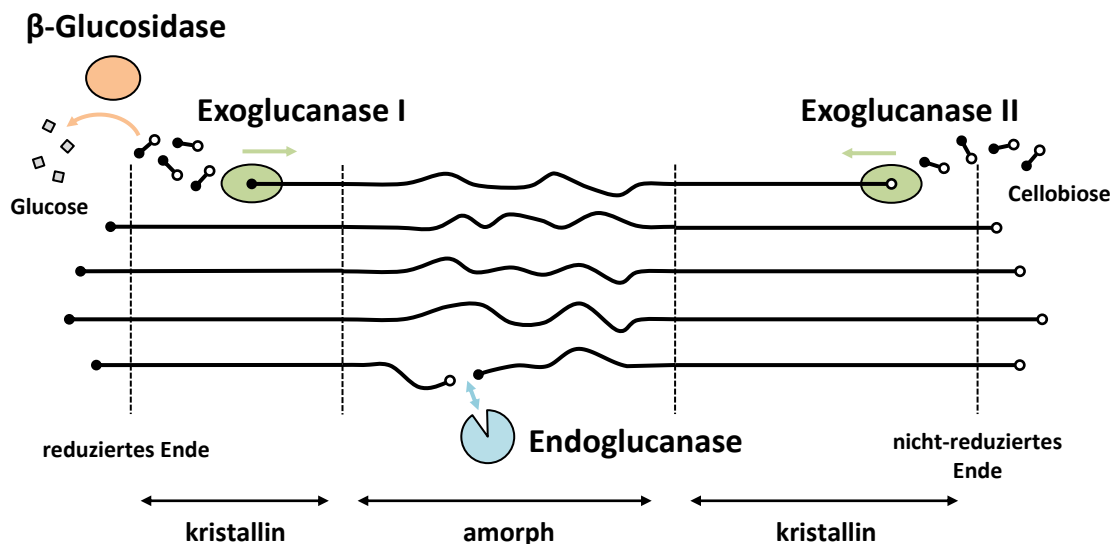


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose zu Glucose mittels Endo- und Exoglucanase sowie β -Glucosidase (modifiziert nach Lynd et al., 2002).

2.5.3 Prozessführung bei Biokonversionen

Bei der Durchführung von Biokonversionen wird zwischen zwei möglichen Prozessvarianten unterschieden, die schematisch in Abbildung 2.6 dargestellt sind. Beide Varianten haben gemeinsam, dass der eingesetzte agrarische Reststoff zunächst in einer optionalen Prozessstufe vorbehandelt werden kann, um die Effektivität der folgenden Prozessschritte zu verbessern (Lynd et al., 2002).

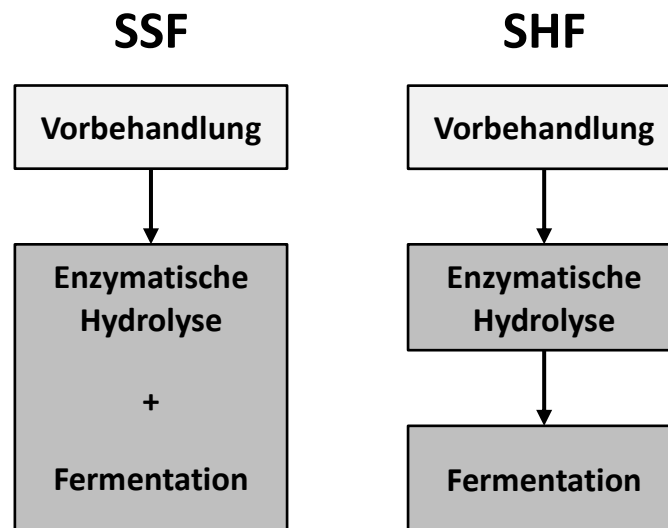


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Prozessvarianten bei Biokonversionen (modifiziert nach Lynd et al., 2002); SSF - Simultane Verzuckerung und Fermentation, SHF - Separate Hydrolyse und Fermentation.

Erfolgen die anschließende enzymatische Monomerisierung der Polysaccharide und die fermentative Produktbildung räumlich und zeitlich parallel in einem Bioreaktor, wird diese Form der Prozessführung als simultane Verzuckerung und Fermentation (SSF, englisch - simultaneous saccharification and fermentation) bezeichnet. Vorteilhaft ist hierbei, dass die enzymatisch freigesetzten Monosaccharide direkt mikrobiell verstoffwechselt werden. Einer Produktinhibierung der eingesetzten Cellulasen durch Glucose bzw. Cellobiose wird somit entgegengewirkt (Olsson et al., 2005). Dies wirkt sich prinzipiell positiv auf die Effektivität der enzymatischen Hydrolyse aus. Außerdem resultiert die Zusammenlegung von zwei Prozessstufen in einer Reduktion des Prozessaufwand, die sich in geringeren Prozesskosten widerspiegeln kann (Alfani et al., 2000). Nachteilig ist dagegen, dass bei SSF-Biokonversionen ein Kompromiss bezüglich der Reaktionsbedingungen von enzymatischer Hydrolyse und Fermentation erforderlich ist, der sich gegebenenfalls negativ auf Effektivität der Biokonversion auswirkt. Dies betrifft vor allem die Konfiguration der Reaktionstemperatur und des pH-Werts, bei denen beide Prozessschritte unterschiedliche Optima aufweisen können (Oh et al., 2000).

Wird dagegen die enzymatische Hydrolyse getrennt von der Fermentation durchgeführt, wird diese Prozessvariante als separate Hydrolyse und Fermentation (SHF, englisch - separate hydrolysis and fermentation) bezeichnet. Der Vorteil dieser Prozessvariante besteht in der optimalen Regulierung der beiden Prozessstufen. So können sowohl für die eingesetzten Enzyme als auch für den verwendeten Produktionsstamm, bezüglich der Temperatur, pH-Wert und weitere Prozessparameter, ideale Reaktions- bzw. Kultivierungsbedingungen gewährleistet werden (Alfani et al., 2000). Nachteilig ist dagegen, dass bei der enzymatischen Hydrolyse durch die Bildung von hohen Konzentrationen an

Glucose und anderer Monosaccharide produktinhibierende Effekte auftreten können, die die Aktivität der eingesetzten Cellulasen reduzieren (Sun und Cheng, 2002).

Bezüglich der spezifischen Verwendung des agrarischen Reststoffs Apfeltrester als Ausgangssubstrat und des Pilzes *Rhizopus arrhizus* zur Produktion von Fumarsäure ist prinzipiell eine weitere, abweichende SHF-Prozessführung denkbar. Begründet ist dies durch die Präsenz eines hohen Anteils an bereits monomer vorliegenden, wasserlöslichen Zuckern. Diese können mittels einer separaten Prozessstufe vom Apfeltrester isoliert werden und für die anschließende Fermentation genutzt werden. Unter einem Verzicht der Nutzung von in Apfeltrester strukturell gebundenen Sacchariden ist somit keine enzymatische Hydrolyse bei dieser Prozessvariante erforderlich.

3. Material und Methoden

3.1 Kultivierung von *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526

In dieser Arbeit wurde *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 zur fermentativen Produktion von Fumarsäure verwendet. Der Produktionsstamm wurde über die Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL, USA) bezogen. Alle Kultivierungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.1.1 Medienzusammensetzung

Zur Herstellung der unterschiedlichen Medien wurden für häufig benötigte Komponenten separate Stammlösungen angesetzt und diese bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Abweichend hierzu wurden die Stammlösungen von FeSO₄ und FeCl₃ sterilfiltriert. Das Zusammenfügen der einzelnen Lösungen zum gebrauchsfertigen Medium erfolgte unter einer Sterilwerkbank. Bei Kultivierungen mit alternativen Substratquellen wurde Glucose durch die entsprechende Kohlenstoffquelle ersetzt.

Tabelle 3.1: Stammlösungen zur Herstellung der Kultivierungsmedien.

Stammlösung	Konzentration [g/L]
Glucose	300
(NH ₄) ₂ SO ₄	200
KH ₂ PO ₄	80
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	50
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	17,6
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	25
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,5
MnSO ₄ x H ₂ O	3,8
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,782
Weinsäure x H ₂ O	1,68

3.1.1.1 Medium A

Medium A nach Ling und Ng (1989) wurde zur Produktion der Sporensuspension verwendet. Zur Herstellung von Medium A wurden die einzelnen Komponenten direkt eingewogen bzw. als Stammlösung hinzugegeben und das entsprechende Volumen durch Zugabe von Reinstwasser eingestellt. Die Zugabe von sterilem FeSO_4 erfolgte dabei nach dem Autoklavieren des Mediums. Zur Herstellung der Agarplatten wurde das noch warme Medium A in Petrischalen gegossen und zum Aushärten offen unter einer Sterilwerkbank platziert.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung von Medium A nach Ling und Ng (1989).

Substanz	Konzentration [g/L]
Glucose	4
Glycerin	10 mL
Lactose x H_2O	6,32
Harnstoff	0,6
KH_2PO_4	0,4
Maisquellwasser	1 mL
Trypton/Pepton	1,6
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,3
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,088
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,038
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,00782
NaCl	40
KCl	0,4
Agar-Agar	30
Reinstwasser	ad. 1 L

3.1.1.2 Medium B

Medium B nach Ling und Ng (1989) wurde in den entsprechenden Vorkulturen zum Auskeimen der Sporen und zur Anzucht von Biomasse verwendet.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung von Medium B nach Ling und Ng (1989).

Substanz	Konzentration [g/L]
Glucose	40
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,0
KH_2PO_4	1,6
Maisquellwasser	0,5 mL
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,4
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,044
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,0075
Weinsäure $\times \text{H}_2\text{O}$	0,0084
Reinstwasser	ad. 1 L

3.1.1.3 Medium C

Medium C nach Ling und Ng (1989) wurde bei den entsprechenden Hauptkulturen als Produktionsmedium eingesetzt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung von Medium C nach Ling und Ng (1989).

Substanz	Konzentration [g/L]
Glucose	130
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,8
KH_2PO_4	0,3
Maisquellwasser	0,5 mL
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,4
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,044
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,0075
Weinsäure $\times \text{H}_2\text{O}$	0,0084
Reinstwasser	ad. 1 L

3.1.1.4 Optimierte Medium C

Im Rahmen einer Medienoptimierung wurde das Medium C nach Ling und Ng (1989) hinsichtlich einer effektiveren Fumarsäureproduktion modifiziert. Hierzu wurde in den entsprechenden Versuchen die Konzentration eines einzelnen Medienbestandteils variiert. Bei einer Verbesserung des Kultivierungssystems wurde die vorgenommene Veränderung für weitere Optimierungsschritte übernommen. Das dadurch erhaltene optimierte Medium C ist in Tabelle 3.5 dargestellt und wurde in weiteren Kultivierungen sowohl als Vorkulturmedium als auch Hauptkulturmedium eingesetzt.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des optimierten Medium C.

Substanz	Konzentration [g/L]
Glucose	130
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	0,3
Maisquellwasser	-
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,4
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,044
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,0075
Weinsäure x H ₂ O	-
Reinstwasser	ad. 1 L

3.1.2 Herstellung der Sporensuspension und Stammhaltung

Zur Herstellung einer Sporensuspension wurden 60 µL Kryokultur auf einer sterilen Agarplatte mit Medium A (s. Tabelle 3.2) ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend mit Parafilm verschlossen und bei 32 °C für 6 - 7 d inkubiert, bis sich der ausgebildete Pilzrasen vollständig bräunlich verfärbt hatte. Zur Ernte der Sporen wurden 10 mL einer 0,9 %igen (w/v) NaCl-Lösung auf den sporulierten Pilzrasen gegeben. Durch mechanisches Einwirken mittels Drigalskispatel wurden die Sporen in der Lösung suspendiert. Die dadurch gewonnene Sporensuspension wurde in ein steriles 50 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Zur Bestimmung der vorliegenden Sporenkonzentration wurde eine Thoma-Zählkammer verwendet (s. Kapitel 3.3.5).

Neben dem Animpfen von Kultivierungen wurde die Sporensuspension auch zur Stammhaltung verwendet. Hierzu wurde die Sporensuspension mit sterilem Pharmaglycerin in 2 mL Kryogefäßen vermischt (50 % (v/v)) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Kryokulturen erfolgte bei - 80 °C.

3.1.3 Kultivierungen im Schüttelkolben

3.1.3.1 Kultivierung nach Ling und Ng (1989)

Bei der Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 nach Ling und Ng (1989) wurde zur Anzucht von Biomasse zunächst eine Vorkultur durchgeführt. Hierzu wurden 3 g/L CaCO_3 und 50 mL Medium B in einem 300 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen vorgelegt. Der Kultivierungsansatz wurde mit Sporensuspension angeimpft, sodass eine initiale Sporenkonzentration von 10^5 Sporen/mL vorlag. Die Schüttelkolben wurden bei 32 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator mit einer Auslenkung von 50 mm für 18 - 24 h inkubiert.

Für die anschließende Hauptkultur wurden 50 g/L CaCO_3 und 90 mL Medium C in einem 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen vorgelegt. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte durch Zugabe von 10 mL Vorkultur. Um dabei eine reproduzierbare Menge an Biomasse zu transferieren, wurde der Vorkulturansatz kontinuierlich unter der Sterilwerkbank geschüttelt und somit einer Sedimentation der Biomasse entgegengewirkt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bei 34 °C und einer Schüttelfrequenz von 200 rpm im Schüttelinkubator (50 mm Auslenkung).

3.1.3.2 Referenzkultivierung mit direkter Sporeninokulation

Bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation wurde auf eine separate Anzucht der Biomasse im Rahmen einer Vorkultur verzichtet. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte durch eine direkte Zugabe von Sporensuspension. Die Inokulationskonzentration betrug dabei 10^5 Sporen/mL. Vorbereitend wurden für die Kultivierung 50 g/L CaCO_3 und 100 mL optimiertes Medium C in einen 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen vorgelegt. Die Inkubation erfolgte bei 34 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator (50 mm Auslenkung). Zur Aufrechterhaltung eines pH-Werts von ca. 6 wurde während der Kultivierung in regelmäßigen Abständen und unter sterilen Bedingungen jeweils 10 g/L CaCO_3 in Form eines Feststoff-Feeds hinzugegeben.

3.1.3.3 Referenzkultivierung mit Vorkultur

Bei dieser Kultivierungsstrategie wurden sowohl in der Vorkultur als auch in der Hauptkultur 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen und das optimierte Medium C verwendet. Das Kultivierungsvolumen betrug bei beiden Ansätzen jeweils 100 mL. Zur Regulierung des pH-Werts wurde in beiden Kultivierungsschritten 50 g/L CaCO_3 vorgelegt und falls erforderlich zusätzliches CaCO_3 in der Hauptkultur hinzugegeben. Die Inokulation der Vorkultur erfolgte mit Sporensuspension und einer initialen Konzentration von 10^5 Sporen/mL. Nach 24 h Vorkultur wurde die Hauptkultur mit 10 % (v/v) Vorkulturansatz angeimpft. Die Inkubation beider Kultivierungsstufen erfolgte bei 34 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator (50 mm Auslenkung).

3.1.3.4 Referenzkultivierung mit separater Produktion von Biomasse

Zur Untersuchung einer vollständig wachstumsentkoppelten Produktion von Fumarsäure wurde eine dreistufige Kultivierungsstrategie mit separater Biomasseproduktion angewendet. Die ersten beiden Kultivierungsschritte (zweistufige Vorkultur) dienten hierbei der Ausbildung von ausreichend Biomasse, die in der abschließenden Prozessstufe (Hauptkultur) zur Bildung von Fumarsäure eingesetzt wurde.

Bei der zweistufigen Vorkultur wurde die in Kapitel 3.1.3.3 beschriebene Kultivierungsvorschrift mit optimiertem Medium C als Vorlage verwendet. Abweichend hierzu wurde bei der zweiten Prozessstufe eine reduzierte Konzentration von 40 g/L CaCO_3 eingesetzt. Dies ermöglichte ein vollständiges Aufbrauchen des eingesetzten CaCO_3 innerhalb von 2 d und erleichterte dadurch die Abtrennung der bis zu diesem Zeitpunkt ausgebildeten Biomasse. Zur Separierung der Biomasse vom Vorkulturmedium wurden je Schüttelkolbenansatz 200 mL steriles Reinstwasser unter einer Sterilwerkbank hinzugegeben und somit ausgefallene Fumarsäure bzw. Calciumfumarat gelöst. Zu diesem Zeitpunkt bildete die Biomasse den einzigen Feststoff innerhalb des Kultivierungsansatzes. Nachdem die Biomasse vollständig am Boden des Schüttelkolbens sedimentiert war, wurde der Überstand vorsichtig mit einer serologischen Pipette entfernt und das Volumen auf ca. 100 mL reduziert. Um den Anteil des Vorkulturmediums weiter zu verdünnen wurde dieser Vorgang ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde die gewaschene Biomassesuspension zur schnelleren Sedimentation in einen 100 mL Messzylinder überführt und durch Entfernen des biomassefreien Überstand mittels einer serologischen Pipette wurde die Suspension auf ein Volumen von 30 mL eingeeengt.

Für die anschließende Hauptkultur wurden 50 g/L CaCO_3 und 100 mL optimiertes Medium C in einen 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen vorgelegt. Abweichend zum optimierten Medium C der beiden Vorkulturen enthielt das Medium der Hauptkultur allerdings kein $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Durch Zugabe der 30 mL gewaschenen und eingeeengten Biomassesuspension wurde die Hauptkultur angeimpft und bei 34 °C, 200 rpm inkubiert. Bei Bedarf wurde durch eine Zugabe von weiterem CaCO_3 der pH-Wert über den gesamten Zeitraum der Hauptkultur reguliert.

3.1.4 Kultivierungen im 1 L-Reaktor

Für die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 in Bioreaktoren wurde ein DasGip-Reaktorsystem der Firma Eppendorf GmbH (Jülich) verwendet. Die Anlage bestand aus vier baugleichen Reaktoren, die parallel betrieben werden konnten. Die technischen Daten des DasGip-Systems sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Technische Daten des DasGip-Reaktorsystems.

Komponente	Technische Daten
Reaktortyp	SR1000ODLS
Fassungsvermögen	1000 mL
Antrieb	direkter Überkopfantrieb
Rührer	2x 6-Blatt-Scheibenrührer
Begasung	Begasungsfritte (10 µm Porengröße)
Abgaskondensation	Wasserkühlung
Sensoren	pH-Elektrode pO ₂ -Elektrode Temperatursensor

Zur Sterilisation der Bioreaktoren wurden die benötigte Menge an CaCO₃ in die Reaktoren vorgelegt, alle Öffnungen mit Septen verschlossen und die Reaktoren bei 121 °C, 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Der Einbau der Sensoren (pH und pO₂-Elektroden) erfolgte unter sterilen Bedingungen nach dem Abkühlen der Reaktoren und Zugabe des Mediums. Hierzu wurden die Elektroden mit Reinstwasser gereinigt und mit Ethanol desinfiziert. Im Vorfeld wurde die pO₂-Elektrode für mindestens 8 h an das DasGip-System angeschlossen und polarisiert. Die Kalibrierung der Sonde erfolgte im vollständig aufgebauten und angeschlossenen Reaktor mit temperiertem Medium durch eine Zweipunktkalibrierung. Hierzu wurde das System mit Stickstoff (0 % Sauerstoffsättigung) und Luft (100 % Sauerstoffsättigung) begast. Die pH-Elektrode wurde vor dem Einbau mittels Pufferlösungen (pH 4,0 und pH 7,0) kalibriert. Um einer Schaumbildung während der Kultivierung vorzubeugen, wurde dem Medium vor der Inokulation 200 µL steriles Antischaummittel (Ucolub N-115) hinzugegeben. Die Regulierung von Prozessparametern und die Aufzeichnung von online-Daten erfolgte mittels DasGip-Software (DasGip Control 4).

3.1.4.1 Reaktorkultivierung mit direkter Sporeninokulation

Bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation wurden 50 g/L CaCO₃ und 600 mL optimiertes Medium C im Reaktor vorgelegt. Die Inokulation erfolgte durch Zugabe von Sporensuspension unter sterilen Bedingungen, sodass eine initialen Konzentration von 10⁵ Sporen/mL vorlag. Nach der Inokulation wurden die Reaktoren an die DasGip-Anlage angeschlossen und die Aufzeichnung der online-Daten gestartet. Die Kultivierung erfolgte bei 34 °C, einer konstanten Rührerdrehzahl von 400 rpm und einer Begasungsrate von 6,0 L/h (Luft). Falls erforderlich wurde die Begasungsfritte während der Kultivierung ausgetauscht. Hierzu wurde die Prozesssteuerung kurzzeitig unterbrochen und die Begasungsfritte unter einer Sterilwerkbank gewechselt.

3.1.4.2 Reaktorkultivierung mit Vorkultur

Zur vorgeschalteten Anzucht von Biomasse wurde zunächst eine Vorkultur mit 50 g/L CaCO_3 und 100 mL optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen über 24 h durchgeführt (s. Kapitel 3.1.3.3). Für die anschließende Reaktorkultivierung wurden 50 g/L CaCO_3 und 540 mL optimiertes Medium C im Reaktor vorgelegt. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte durch Zugabe von 60 mL gut durchmischter Vorkultur unter einer Sterilwerkbank. Nach dem Anschließen der Reaktoren wurden die Kultivierung bei 34 °C, 400 rpm und einer Begasungsrate von 6,0 L/h (Luft) durchgeführt. Bei Reaktorkultivierungen mit Vorkultur wurde auf den Einsatz einer pH- und pO_2 -Elektrode verzichtet. Ein Wechsel der Begasungsfritte war nicht erforderlich. Zur Regulierung des pH-Werts wurde während der Kultivierung einmalig weiteres CaCO_3 hinzugegeben. Hierzu wurde die Prozesssteuerung kurzzeitig unterbrochen und unter einer Sterilwerkbank 20 g/L CaCO_3 in Form eines Feststoff-Feed hinzugegeben.

3.1.5 Probenahme und Probenaufbereitung

Zur Aufzeichnung von Kultivierungsverläufen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen. Bei Schüttelkolbenkultivierungen erfolgte die Probennahme unter einer Sterilwerkbank und für jeden Kolben einzeln. In diesem Zuge wurde ebenfalls durch Auswiegen der Schüttelkolben und Berechnung der Gewichts Differenz die Verdunstung von Flüssigkeit bestimmt. Durch Zugabe von sterilem Reinstwasser wurde diese ausgeglichen, sodass über den gesamten Kultivierungsverlauf eine Aufkonzentrierung durch Verdunstungseffekte ausgeschlossen werden konnte. Bei der Probennahme wurden 2 mL gut durchmischter Probe mit einer abgeschnittenen 5 mL Pipettenspitze in ein Reagenzglas mit Schraubverschluss pipettiert. Diese Probe diente zur Konzentrationsbestimmung des Substrats, Fumarsäure und Nebenprodukten, die mittels HPLC-Analyse (s. Kapitel 3.3.1) quantifiziert wurden. Außerdem wurden zur Bestimmung des pH-Werts ca. 300 μL gut durchmischte Probe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und direkt vermessen.

Bei Kultivierungen in 1 L-Reaktoren erfolgte die Probenahme direkt an der DasGip-Anlage. Hierzu wurde ein Septum am Reaktor geöffnet und mit einer abgeschnittenen, desinfizierten 5 mL serologischen Pipette wurden die Proben entnommen. Um dabei das Risiko einer Kontamination zu minimieren, wurde der Bereich der Probenahme gründlich mit Ethanol desinfiziert. Außerdem wurde während der Probenahme die Begasung des Kultivierungsansatzes unterbrochen, um das Pipettieren von Gasblasen zu vermeiden. Des Weiteren wurde die Rührerdrehzahl kurzzeitig auf 600 rpm erhöht, um potenziell in Totzonen des Reaktors sedimentierte Fumarsäure aufzuwirbeln und somit eine repräsentative Probe zu entnehmen.

Zur Konzentrationsbestimmung mittels HPLC-Analyse wurden die Proben aufbereitet. Hierzu wurden in das Reagenzglas (inkl. 2 mL Kultivierungsprobe) 8 mL Reinstwasser gegeben, das Reagenzglas verschlossen, gut durchmischt und für 10 min in einem Wasserbad auf 80 °C erhitzt. Durch das Erhitzen der Probe wurde die vorliegende Fumarsäure bzw. Calciumfumarat vollständig gelöst. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur wurden 400 μL der verdünnten Probe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit 600 μL einer 5 mM H_2SO_4 -Lösung sowie 200 μL einer 3,5 M H_2SO_4 -Lösung weiter verdünnt. Die Zugabe von H_2SO_4 sorgte hierbei für ein Abreagieren des noch vorliegenden CaCO_3 -Feststoffs zu gelöstem CaSO_4 , CO_2 und Wasser. Zur Abtrennung der noch

vorliegenden Biomasse wurde die Probe bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der feststofffreie Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurden 200 µL dieser Probe und 800 µL einer 5 mM H₂SO₄-Lösung in ein HPLC-Vial gegeben und die Probe mittels HPLC analysiert.

Aufgrund der verschiedenen Verdünnungsschritte beträgt der absolute Verdünnungsfaktor bei der Probenaufbereitung 1:75. Abweichend zu diesem Vorgehen wurde bei Kultivierungsproben, bei denen eine Fumarsäurekonzentration von > 80 g/L vorlag, eine höhere Verdünnung gewählt. Hierzu wurde bei der Zugabe von Reinstwasser (erste Verdünnungsstufe zum Lösen von Fumarsäure bzw. Calciumfumarat) anstelle von 8 mL ein Volumen von 12 mL Reinstwasser in das Reagenzglas gegeben. Der finale Verdünnungsfaktor der aufbereitenden Probe betrug in diesem Fall 1:105.

3.2 Apfeltrester

Der in dieser Arbeit verwendete Apfeltrester wurde vom Fruchtsafthersteller riha WeserGold bezogen. Dabei werden von riha WeserGold zur Apfelsaftherstellung (Direktsaft) prinzipiell verschiedene Apfelsorten aus konventionellem Anbau verwendet. Nach der Ernte, die im Jahr 2015 erfolgte, wurden die Äpfel kühl gelagert und nach Bedarf gepresst. Bei dem zur Verfügung gestellten Trester erfolgte die Pressung im Mai 2016. Aufgrund der geringen Haltbarkeit wurde der bereitgestellte Apfeltrester direkt nach der Pressung bei - 20 °C eingelagert und zur Durchführung der entsprechenden Versuche schonend bei 4 °C aufgetaut.

3.2.1 Bestimmung der Zusammensetzung von Apfeltrester

Bestimmung der Biotrockenmasse und der Restfeuchte

Der Anteil der Biotrockenmasse bzw. der Restfeuchte von Apfeltrester wurde gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurden 20 g aufgetauter Apfeltrester in einem ausgewogenen Porzellantiegel bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, in einem Exsikkator abgekühlt und ausgewogen. Durch die Berechnung der Gewichts Differenz wurde der Anteil an Trockenmasse und Restfeuchte berechnet.

Bestimmung des Aschegehalts

Zur Bestimmung des Aschegehalts wurden 5 g getrockneter Apfeltrester in einem Muffelofen bei 550 °C für 24 h verascht und nach dem Abkühlen der Proben in einem Exsikkator ausgewogen.

Bestimmung des Stickstoffgehalts nach Kjeldahl

Der Stickstoffgehalt von Apfeltrester wurde nach Kjeldahl bestimmt. Hierzu wurde 1 g getrockneter Apfeltrester in einen Aufschlusskolben eingewogen. Anschließend wurden Siedesteinchen, ein Kjeltab (5 g K₂SO₄ und 5 mg Selen) und 10 mL einer 96 %igen H₂SO₄-Lösung hinzugegeben. Nach einer Standzeit von ca. 24 h bei Raumtemperatur erfolgte der thermische Aufschluss im Kjeldatherm der Firma Gerhardt (Königswinter). Das dabei verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7: Temperaturprogramm beim thermischen Aufschluss nach Kjeldahl.

Temperatur	Dauer
100 °C	30 min
200 °C	60 min
300 °C	60 min
420 °C	60 min
Raumtemperatur	30 min

Nach dem thermischen Aufschluss lag der Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat vor, das durch Zugabe von Natriumhydroxid zu Ammoniak reagierte. Das leicht flüchtige Ammoniak wurde anschließend mittels Wasserdampfdestillation aus der Probe ausgetrieben, in eine definierte Menge an 2 %iger Borsäure-Lösung eingeleitet und reagierte dort stöchiometrisch zu Ammoniumborat weiter. Durch eine Rücktitration mit 0,05 M H₂SO₄-Lösung bis zum ursprünglichen pH-Wert der Borsäure-

Lösung wurde abschließend die eingeleitete Menge an Ammoniak bestimmt und basierend darauf der Stickstoffgehalt berechnet. Für die Destillation und Titration wurde die Vapodest-Anlage der Firma Gerhardt verwendet.

Bestimmung der einzelnen Bestandteile mittels Fraktionierung

Zur Quantifizierung der einzelnen Apfeltresterbestandteile wurden 40 g aufgetaute Probe händisch in drei Fraktionen unterteilt. Die erste Fraktion bildeten hierbei Teile der Schale, des Fruchtfleischs und des Kerngehäuses. Die zweite Fraktion beinhaltete Kerne und in die dritte Fraktion wurden Stiele sortiert. Nach einer separaten Trocknung bei 105 °C über 48 h wurde der Anteil der einzelnen Fraktionen gravimetrisch bestimmt.

Bestimmung der anteiligen Zuckerzusammensetzung

Da in Apfeltrester sowohl wasserlösliche Zucker und auch strukturell gebundene Polysaccharide enthalten sind wurden zur Quantifizierung beider Zuckerfraktionen zwei aufeinander folgende Analyseverfahren angewendet. Vorbereitend wurde hierzu Apfeltrester schonend bei einer Temperatur von 60 °C in einem Trockenschrank bis zur Massenkonstanz getrocknet. Anschließend wurde der getrocknete Apfeltrester mit einer Ultrazentrifugalmühle der Firma Retsch (Haan) bei 18.000 rpm beschleunigt und mechanisch zerkleinert. Durch die Verwendung eines integrierten Siebs (Porengröße 1,0 mm) wies der getrocknete und mechanisch zerkleinerte Apfeltrester eine Partikelgröße von $\leq 1,0$ mm auf.

Zur Bestimmung der frei vorliegenden, wasserlöslichen Zucker wurden 0,8 g des Apfeltresterpulvers in ein 50 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und mit Reinstwasser auf ein Volumen von 40 mL aufgefüllt. Somit lag bei der Extraktion der wasserlöslichen Saccharide ein Feststoffanteil von 2 % (w/v) vor. Der Reaktionsansatz wurde bei 500 rpm und Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Zur Quantifizierung der extrahierten Zucker wurde eine Probe von 1 mL in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand mittels eines Spritzenvorsatzfilters aus Nylon (Porengröße 0,22 μ m) filtriert. Abschließend wurde die feststofffreie Probe mit Reinstwasser weiter verdünnt und die Konzentration an wasserlöslichen Zuckern mittels HPAEC-PAD (s. Kapitel 3.3.2) bestimmt.

Zur Bestimmung der in Apfeltrester strukturell gebunden Polysaccharide wurde der zuvor beschriebene Reaktionsansatz weiterverwendet. Vorbereitend wurden hierfür alle noch vorliegenden wasserlöslichen Zucker vom Apfeltresterfeststoff entfernt. Dies geschah durch Zentrifugation des Reaktionsansatzes bei 8.500 rpm für 5 min, Verwerfen des Überstands, erneutes Resuspendieren des Feststoffs in Reinstwasser. Insgesamt wurde dieser Vorgang drei Mal wiederholt, sodass beim dritten Waschschrift keine wasserlöslichen Zucker mehr im Überstand detektiert werden konnten. Die Trocknung des gewaschenen Apfeltresterpulvers erfolgte bei 60 °C bis zur Massenkonstanz. Die Quantifizierung der strukturellen Zucker erfolgte durch eine zweistufige Säurehydrolyse nach dem technischen Report des NREL (National Renewable Energy Laboratory, Golden, USA; Sluiter et al., 2008). Hierzu wurden 0,3 g getrocknetes und gewaschenes Apfeltresterpulver in eine 100 mL Laborflasche eingewogen und ein Magnetrührkern hinzugegeben. Die Probe wurde mit 3 mL einer 72 %igen H_2SO_4 -Lösung versetzt, gut durchmischt und für 60 min in einem Wasserbad auf 30 °C erwärmt. Während der Inkubation wurde die Probe alle 5 min manuell durchmischt. Für die zweite Hydrolysestufe wurden die Probe mit 84 mL Reinstwasser verdünnt, durchmischt und für 60 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

Nach dem Abkühlen wurden 30 mL Probe in ein Becherglas überführt und durch Zugabe von CaCO_3 wurde der pH-Wert auf ca. 6,5 eingestellt. Anschließend wurden 1 mL Probe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand mittels eines Spritzenvorsatzfilters aus Nylon (Porengröße 0,22 μm) filtriert. Die abschließende Bestimmung der freigesetzten Monosaccharide erfolgte mittels HPAEC-PAD (s. Kapitel 3.3.2), nach einer weiteren Verdünnung der feststofffreien Probe mit Reinstwasser.

3.2.2 Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit aus Apfeltrester

Um die in Apfeltrester enthaltenen Zucker für eine biotechnologische Umsetzung zu Fumarsäure nutzbar zu machen, wurden insgesamt drei verschiedene Prozessstrategien zur Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit untersucht. Als Zielgrößen wurde hierbei das Vorliegen der Zucker in gelöster und monomerisierter Form, sowie eine Zuckerkonzentration von insgesamt 100 - 130 g/L festgelegt.

Zur Bestimmung der vorliegenden Zuckerkonzentration wurde an den entsprechenden Stellen 1 mL Probe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand mittels eines Spritzenvorsatzfilters aus Nylon (Porengröße 0,22 μm) filtriert. Nach einer weiteren Verdünnung mit Reinstwasser wurde die Probe mittels HPAEC-PAD (s. Kapitel 3.3.2) analysiert. Neben der Zuckerkonzentration wurden alle relevanten Massenströme innerhalb des Prozesses erfasst, um eine vollständige Bilanzierung der verschiedenen Prozessstrategien durchführen zu können.

3.2.2.1 Zusätzliches Auspressen

Bei der Prozessstrategie des zusätzlichen Auspressens wurden 500 g schonend aufgetauter Apfeltrester in eine hydraulische Packpresse (HP-2 H, Fischer Maschinenfabrik, Neuss) gefüllt und für 20 min bei einem konstanten Pressdruck von 20 bar ausgepresst. Der dabei separierte Presssaft wurde über eine unter dem Auslauf der Presse platzierten Waage gravimetrisch erfasst. Der in der Presse zurückgebliebene Presskuchen wurde händisch entnommen.

3.2.2.2 Dreistufige Extraktion mit Wasser

Bei der Extraktion von Apfeltrester mit Wasser wurden 500 g aufgetauter Apfeltrester in einen Messbecher vorgelegt, mit 250 g Reinstwasser versetzt und für 20 min manuell durchmischt. Das Extraktionsverhältnis von Apfeltrester zu Wasser betrug somit 2/1 (w/w). Zur Abtrennung der zuckerhaltigen Flüssigkeit wurde der Ansatz in die hydraulische Packpresse überführt und bei 20 bar ausgepresst. Die Pressung wurde beendet sobald die ursprünglich hinzugegebene Menge an Wasser abgepresst war. Für weitere Extraktionsstufen wurde der in der Presse zurückgebliebene Presskuchen ausgewogen, in einem Messbecher händisch aufgelockert und erneut mit Reinstwasser (Extraktionsverhältnis 2/1) versetzt. Insgesamt wurden drei Extraktionsstufen durchgeführt.

Zur Erhöhung der vorliegenden Zuckerkonzentration wurden die drei Extrakte separat voneinander thermisch aufkonzentriert. Hierzu wurden die Extrakte in Bechergläser überführt, ein Magnetrührkern

hinzugegeben und bei konstantem Durchmischen mittels Magnetrührer auf eine Temperatur von ca. 90 °C erhitzt. Durch gravimetrische Kontrolle des Gewichtsverlusts während der Aufkonzentrierung wurde die Zuckerkonzentration auf den gewünschten Zielwert eingestellt und mittels HPAEC-PAD-Analyse überprüft.

3.2.2.3 Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse von schonend aufgetautem Apfeltrester wurde in einem 800 mL Doppelwand-Glasreaktor bei einer Temperatur von 50 °C durchgeführt. Die Durchmischung des Reaktionsansatzes erfolgte bei 50 rpm mit einem Blattrührer. Zur Hydrolyse wurde das Enzympräparat Biogazyme 2x (B2x) von ASA Spezialenzyme GmbH (Wolfenbüttel) verwendet, das unter idealen Reaktionsbedingungen (50 °C, pH 4,0 - 4,8) eine Cellulaseaktivität/Filter Paper Unit (FPU) von 200 FPU/g_{B2x} aufweist (Eidt, 2015). Zur Pufferung des pH-Wertes und zur Einstellung des Feststoffanteils an Apfeltrester wurde zu Beginn der Reaktion Citrat-Puffer eingesetzt. Insgesamt wurden zwei unterschiedliche Prozessvarianten zur enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester untersucht, die beide einen gestaffelten Feed an Apfeltrester und Biogazyme 2x beinhalten. Die Unterschiede lagen hierbei in der Konzentration des Citrat-Puffers und in der Menge des eingesetzten Enzympräparats Biogazyme 2x. Der zeitliche Ablauf der Reaktion sowie die dabei eingesetzten Stoffmengen sind vergleichend in Tabelle 3.8 dargestellt. Nach der enzymatischen Hydrolyse wurde der stark verflüssigte Reaktionsansatz in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und bei 8.500 rpm für 30 min zentrifugiert. Durch vorsichtiges Dekantieren des Überstands konnte das Hydrolysat von nicht vollständig hydrolysiertem Apfeltresterfeststoff separiert werden.

Tabelle 3.8: Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester.

Zeitpunkt	Prozessvariante 1		Prozessvariante 2	
Reaktionsstart:	37 g	Apfeltrester ($\pm 10,0$ g _{BTM})	37 g	Apfeltrester ($\pm 10,0$ g _{BTM})
	63 g	0,50 M Citrat-Puffer	63 g	0,05 M Citrat-Puffer
0 d - 1 d	0,50 g	Biogazyme 2x	0,15 g	Biogazyme 2x
	→ 10 % (w/w) BTM-Anteil		→ 10 % (w/w) BTM-Anteil	
	→ 10,0 FPU/g _{BTM} (50 mg _{B2x} /g _{BTM})		→ 3,0 FPU/g _{BTM} (15 mg _{B2x} /g _{BTM})	
Feed 1:	+ 42 g	Apfeltrester ($\pm 11,4$ g _{BTM})	+ 42 g	Apfeltrester ($\pm 11,4$ g _{BTM})
	+ 0,28 g	Biogazyme 2x ($\pm 5,0$ FPU/g frische BTM)	+ 0,08 g	Biogazyme 2x ($\pm 1,5$ FPU/g frische BTM)
1 d - 2 d	→ 15 % (w/w) BTM-Anteil		→ 15 % (w/w) BTM-Anteil	
	→ 7,3 FPU/g _{BTM} (37 mg _{B2x} /g _{BTM})		→ 2,2 FPU/g _{BTM} (11 mg _{B2x} /g _{BTM})	
Feed 2:	+ 100 g	Apfeltrester ($\pm 27,0$ g _{BTM})	+ 100 g	Apfeltrester ($\pm 27,0$ g _{BTM})
	+ 0,67 g	Biogazyme 2x ($\pm 5,0$ FPU/g frische BTM)	+ 0,20 g	Biogazyme 2x ($\pm 1,5$ FPU/g frische BTM)
2 d - 4 d	→ 20 % (w/w) BTM-Anteil		→ 20 % (w/w) BTM-Anteil	
	→ 6,0 FPU/g _{BTM} (30 mg _{B2x} /g _{BTM})		→ 1,8 FPU/g _{BTM} (9 mg _{B2x} /g _{BTM})	

(d = Tage)

3.2.3 Bilanzierungsmodell der verschiedenen Herstellungsstrategien

Um die verschiedenen Herstellungsstrategien vergleichen zu können, wurde ein Bilanzierungsmodell entwickelt, das relevante Prozessdaten zur Herstellung von 1 kg Zucker (\triangleq 1 Functional Unit) erfasst. Hierzu wurden zunächst alle benötigten Materialien und Chemikalien sowie angewendete Prozessvorgänge inventarisiert und die im Labormaßstab durchgeführten Prozessvorgänge auf einen Pilotanlagen-Maßstab übertragen. Die zur Berechnung der spezifischen Herstellungskosten einer Functional Unit verwendeten Prozesseinheiten sind in Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10 dargestellt und erläutert. Die Festlegung der dort dargestellten Kostenpunkte und des Energiebedarfs der einzelnen Prozessvorgänge erfolgte durch das Unternehmen Ekodenge (Ankara, Türkei), das auf Bilanzierungen im Bereich Life Cycle Assessment und Life Cycle Costing spezialisiert ist.

Tabelle 3.9: Inventur der benötigten Materialien und Chemikalien zur Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfelftrester.

Prozesseinheit	Kosten	Bemerkung
Apfelftrester	40 €/t	Kosten beinhalten die Anschaffung von Apfelftrester sowie einen gekühlten Transport über 100 km mittels LKW
Wasser	40 €/t	Deionisiertes Wasser
Biogazyme 2x	25 €/kg	
Citronensäure	0,54 €/kg	
Energie	0,15 €/kWh	

Tabelle 3.10: Inventur der benötigten Prozessvorgänge zur Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfelftrester.

Prozesseinheit	Energiebedarf	Bemerkung
Pressen	10 kWh/t	Pressen von 1 t Biomasse mittels hydraulischer Filterpresse bei 20 bar
Zentrifugation	10 kWh/t	Zentrifugation von 1 t Biomasse mittels Tellerseparator bei 8.500 rpm
Durchmischung	4,07 kWh/d	Durchmischung eines 10 m ³ Reaktors bei 50 rpm
Temperierung	4,31 kWh/d	Temperierung eines 10 m ³ Reaktors bei 50 °C
Konzentrierung	268,5 kWh/t	Thermisches Verdampfen von 1 t Wasser, inklusive Kondensation des Wasserdampfs und Rückführung des kondensierten Wassers

3.2.4 Aufreinigung der zuckerhaltigen Flüssigkeit zu Apfeltrester-Saft

Zur Aufreinigung der auf Basis von Apfeltrester hergestellten zuckerhaltigen Flüssigkeit wurden zwei aufeinanderfolgende Aufreinigungsschritte durchgeführt. Dies beinhaltete die Fällung von Trübstoffen durch eine Zugabe von CaCO_3 und eine Abtrennung von Trübstoffen sowie Ammonium durch eine Kationentauscher-Trennsäule.

Im ersten Aufreinigungsschritt wurden 200 mL zuckerhaltige Flüssigkeit in eine 500 mL Laborflasche vorgelegt und mit 2 g CaCO_3 (1 % (w/v)) versetzt. Die Suspension wurde für 5 min bei Raumtemperatur mittels Magnetrührer durchmischt, anschließend in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 8.500 rpm zentrifugiert. Durch Dekantieren des Überstands wurde die aufgereinigte zuckerhaltige Flüssigkeit von gefällten Trübstoffen und zurückgebliebenem CaCO_3 separiert.

Für den zweiten Aufreinigungsschritt wurden 20 g Kationentauscher (Dowex 50WX8, 50 - 100 μm Partikelgröße) in eine Trennsäule gepackt und durch Zugabe von 125 mM H_2SO_4 -Lösung sowie ausreichendem Spülen mit Reinstwasser wurde der Kationentauscher konditioniert. Nach der Konditionierung wurde die zuckerhaltige Flüssigkeit auf die Trennsäule gegeben und durch Öffnen des Ablassventils ein Volumenstrom von ca. 1 mL/min eingestellt. Nach der ersten Durchleitung der zuckerhaltigen Flüssigkeit wurde der Kationentauscher mit ca. 50 mL einer 125 mM H_2SO_4 -Lösung regeneriert und bis zum Erreichen eines pH-Werts von ca. 7 mit Reinstwasser gespült. Anschließend wurde die zuckerhaltige Flüssigkeit ein zweites Mal über die Trennsäule geleitet. Die auf diese Weise aufgereinigte Flüssigkeit wird in der vorliegenden Arbeit als Apfeltrester-Saft bezeichnet.

Zur Bestimmung der abgetrennten Menge an Ammonium wurde die zuckerhaltige Flüssigkeit vor und nach der Aufreinigung beprobt und die Proben mittels IC-Analyse (s. Kapitel 3.3.3) untersucht.

3.2.5 Simultane Verzuckerung und Fermentation

Aufgrund der unterschiedlichen pH-Optima des verwendeten Enzympräparats Biogazyme 2x und des Produktionsstamms *R. arrhizus* NRRL 1526 wurden zwei unterschiedliche SSF-Prozessstrategien zur Biokonversion von Apfeltrester zu Fumarsäure angewendet. Bei Strategie 1 wurde zur Regulierung des pH-Werts 50 mM Citrat (pH-Wert = 4,8) verwendet. Bezüglich des pH-Werts lagen somit während der Kultivierung optimale Reaktionsbedingungen für das Enzympräparat Biogazyme 2x vor. Dagegen wurden bei Strategie 2 50 g/L CaCO_3 eingesetzt, die im Kultivierungsansatz einen initialen pH-Wert von ca. 6 ermöglichten und somit ideale Bedingungen für den Produktionsstamm boten. Zusätzlich wurde bei der SSF-Strategie 2 eine definierte Menge an optimiertem Medium C, inklusive 130 g/L Glucose hinzugegeben, um dem Produktionsstamm eine zusätzliche Kohlenstoffquelle für die Produktion von Fumarsäure bereitzustellen.

Unabhängig von der Prozessstrategie wurden bei beiden Ansätzen 50 g aufgetauter Apfeltrester in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen vorgelegt und ein Flüssigkeitsvolumen von 50 mL (50 mM Citrat-Puffer bei Strategie 1 bzw. optimiertes Medium C bei Strategie 2) hinzugegeben. Zum Starten der Kultivierung wurden anschließend 0,1 g Biogazyme 2x (\triangleq 1,5 FPU/g_{BTM} bzw. 7,5 mg_{B2x}/g_{BTM}) und 40 mL eingengte und gewaschene Biomasse eingesetzt. Zur Produktion der Biomasse wurde eine Standardkultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporen-inokulation

über 3 d durchgeführt (s. Kapitel 3.1.3.2) und die bis dahin gebildete Biomasse nach der in Kapitel 3.1.3.4 beschriebenen Vorgehensweise aufbereitet. Unter Berücksichtigung der Restfeuchte von Apfeltrester und der hinzugegebenen Flüssigkeitsvolumina betrug der eingesetzte Feststoffanteil an trockenem Apfeltrester 9,5 % (w/v). Die Inkubation der Schüttelkolben erfolgte bei 34 °C und einer Durchmischung von 200 rpm in einem Schüttelinkubator.

3.2.6 Fermentation mit aufgereinigtem Apfeltrester-Saft

Zur fermentativen Produktion von Fumarsäure auf Basis des aufgereinigten Apfeltrester-Safts wurden zwei unterschiedliche Kultivierungsstrategien untersucht. Dies beinhaltete zum einen die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit einfacher Vorkultur, die mit optimiertem Medium C durchgeführt wurde und zum anderen die Kultivierung mit separater Biomasseproduktion, die mittels einer zweistufigen Vorkultur produziert wurde. Der prinzipielle Ablauf beider Kultivierungsstrategien ist in Kapitel 3.1.3.3 und Kapitel 3.1.3.4 beschrieben. Abweichend hierzu wurde im Medium der Hauptkultur auf eine Zugabe von Glucose und Reinstwasser (Einstellen des entsprechenden Volumens) verzichtet. Stattdessen wurden der aufgereinigte Apfeltrester-Saft als Grundlage verwendet und weiteren Bestandteile des optimierten Mediums C hinzugegeben. Je nach Versuchsansatz wurde hierbei teilweise auf eine Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verzichtet. Nach der Inokulation der Hauptkultur wurden die Kultivierungen bei 34 °C und 200 rpm durchgeführt. Zur Regulierung des pH-Wertes wurde bei allen Kultivierungsansätzen eine initiale Konzentration von 50 g/L CaCO_3 verwendet und gegebenenfalls weiteres CaCO_3 hinzugegeben.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Um die Konzentration von Glucose, Fumarsäure und Nebenprodukten (Äpfelsäure, Bernsteinsäure und Ethanol) zu bestimmen, wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, englisch - high performance liquid chromatography) angewendet. Hierzu war im verwendeten System eine HPX-87H-Säule (300 x 7,8 mm, 9 µm Partikelgröße) verbaut, die aus einer Polystyrol-Divinylbenzol-haltigen Matrix mit funktionellen Sulfongruppen bestand und die stationäre Phase bildete. Die Temperatur des Säulenofens betrug 40 °C. Als mobile Phase (Laufmittel) diente 5 mM H₂SO₄-Lösung, die mit einer Flussrate von 0,6 mL/min über die Säule geleitet wurde. Das Injektionsvolumen der jeweiligen Probe betrug 10 µL. Während der 30 minütigen Messung erfolgte die Trennung der verschiedenen Substanzen innerhalb der Säule durch eine Kombination aus verschiedenen Wechselwirkungen wie Ionenaustausch, Ionenausschluss und Größenausschluss. Zur Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Substanzen diente ein duales Detektionssystem. Dabei wurde das Substrat Glucose und die Nebenprodukte mittels Brechungsindex-Detektor (RI-Detektor, englisch - refractive index detector) analysiert und das Produkt Fumarsäure mit einem Ultraviolett-Detektor (UV-Detektor) bei einer Wellenlänge von 250 nm detektiert. Zur Kalibrierung der HPLC wurden in regelmäßigen Abständen externe Standards vermessen. In Tabelle 3.11 sind die einzelnen Komponenten des HPLC-Systems aufgeführt.

Tabelle 3.11: HPLC-System zur Analyse von Glucose, Fumarsäure und Nebenprodukten.

Komponente	Modell	Hersteller
Autosampler	LaChrom Elite L-2200	Hitachi, Tokio, Japan
Pumpe	LaChrom Elite L-2130	Hitachi, Tokio, Japan
Säule	HPX-87H	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Säulenofen	CTO-6A	Shimadzu, Kyoto, Japan
RI-Detektor	Shodex RI-101	Shōwa Denkō, Tokio, Japan
UV-Detektor	LaChrom Elite L-2400	Hitachi, Tokio, Japan
Software	Clarity 6.0	DataApex, Prag, Tschechien

3.3.2 Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischen Detektion

Zur Bestimmung der in Apfeltrester enthaltenen Saccharide wurde eine Hochleistungsanionenaustauschchromatographie gekoppelt mit einer gepulsten amperometrischen Detektion (HPAEC-PAD, englisch - high performance anion exchange chromatography - pulsed amperometric detection) genutzt. Das dafür verwendete System Dionex ICS-5000 der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Sunnyvale, USA) ermöglichte die Trennung und Quantifizierung der Monosaccharide Glucose, Fructose, Xylose, Galactose, Mannose, Arabinose sowie Rhamnose und des Disaccharids Saccharose. In Tabelle 3.12 sind die einzelnen Komponenten des HPAEC-PAD-Systems aufgelistet. Als Laufmittel wurde während einer Messung ein Gradient aus vier Eluenten verwendet, deren anteilige Zusammensetzung in Tabelle 3.13 dargestellt ist. Um die Bildung von Natriumcarbonat innerhalb des Systems zu verhindern, wurden die Eluenten kontinuierlich mit Helium begast. Die Vermessung der Proben erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C und einem Injektionsvolumen von 1 µL. Zur Kalibrierung des Systems wurden bei jeder Messreihe externe Standards vermessen.

Tabelle 3.12: HPAEC-PAD-System zur Analyse von verschiedenen Sacchariden.

Komponente	Modell	Hersteller
Autosampler	AS-AP Autosampler	Dionex, Sunnyvale, USA
Pumpe	DP (Dual Pumpe), inkl. Degasser	Dionex, Sunnyvale, USA
Vorsäule	Dionex CarboPac PA20: BioLC 3 x 30 mm (Guard)	Dionex, Sunnyvale, USA
Säule	Dionex CarboPac PA20: BioLC 3 x 150 mm (Analytical)	Dionex, Sunnyvale, USA
Säulenofen	DC Modul	Dionex, Sunnyvale, USA
Detektor	ED amperometrischer Detektor, inkl. pH-Sonde, Ag/AgCl- Referenzelektrode	Dionex, Sunnyvale, USA
Elektrode	Au-Elektrode, Gold Standard, PAD	Dionex, Sunnyvale, USA
Software	Chromeleon 7	Dionex, Sunnyvale, USA

Tabelle 3.13: Zeitabhängige Zusammensetzung der Eluenten für das HPAEC-PAD-System zur Analyse von verschiedenen Sacchariden; A - Reinstwasser, B - 10 mM NaOH, C - 200 mM NaOH, D - 1 M NaAc + 25 mM NaOH.

Laufzeit	Flussrate	Eluent A	Eluent B	Eluent C	Eluent D
0 min	0,4 mL/min	50 %	50 %	-	-
24 min	0,4 mL/min	40 %	-	45 %	15 %
29 min	0,3 mL/min	-	-	40 %	60 %
34 min	0,3 mL/min	-	-	100 %	-
45 min	0,4 mL/min	50 %	50 %	-	-
52 min	0,4 mL/min	50 %	50 %	-	-

3.3.3 Ionenchromatographie

Die Konzentration des Kations Ammonium und des Anions Phosphat wurde mittels Ionenchromatographie (IC) bestimmt. Hierbei wurde das IC-System Dionex ICS-100 der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Sunnyvale, USA) verwendet, das aus einem Autosampler (AS-40) mit zwei Probenschleifen und einem parallel angeordneten Kationen- sowie Anionen-System bestand. Dadurch war es möglich sowohl Ammonium als auch Phosphat simultan aus einer Probe zu bestimmen. Die einzelnen Komponenten des Doppelsystems und die entsprechende IC-Methode sind in Tabelle 3.14 dargestellt. Zur Vermessung wurden die Proben mit Reinstwasser verdünnt, mittels eines Spritzenvorsatzfilters aus Nylon (Porengröße 0,22 µm) filtriert und ein Probenvolumen von 2 mL in ein Dionex Polyvial mit Filtercap (Thermo Fisher Scientific Inc., Sunnyvale, USA) überführt. Zur Kalibrierung des IC-Systems wurden bei jeder Messreihe externe Kationen- und Anionen-Multielementstandards (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) vermessen.

Tabelle 3.14: IC-Systemkomponenten und Methoden zur Analyse von Kationen und Anionen.

	Kationen-IC	Anionen-IC
Eluent	30 mM Methylsulfonsäure	25 mM NaOH
Flussrate	1 mL/min	1 mL/min
Injektionsvolumen	25 µL	25 µL
Degasser	Degasys DG-1300	Degasys DG-1300
Vorsäule	IonPac CG16, 5 x 50 mm	IonPac AG11-HC, 4 x 50 mm
Säule	IonPac CS16, 5 x 250 mm	IonPac AS11-HC, 4 x 250 mm
Temperatur	40 °C	Raumtemperatur
Suppressor	CSRS-500 (4 mm)	ASRS-300 (4 mm)
Suppressorstrom	88 mA	68 mA
Software	Chromeleon 7	Chromeleon 7

3.3.4 Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die Quantifizierung der in Calciumcarbonat enthaltenen Spurenelemente Eisen, Magnesium und Zink erfolgte mittels optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES, englisch - inductively coupled plasma - optical emission spectrometry). Vorbereitend wurden hierzu 0,5 g CaCO₃ in einen 50 mL Messkolben mit Rührkern vorlegt, mit 6 mL Reinstwasser versetzt und auf eine Temperatur von 100 °C erhitzt. Anschließend wurden nacheinander 6 mL einer 65 %igen HNO₃-Lösung (siedend für 10 min gerührt) und 6 mL einer 30 %igen H₂O₂-Lösung (siedend für 45 min gerührt) hinzugegeben. Ohne eine weitere Temperierung des Ansatzes wurden abschließend 2,5 mL einer 37 %igen HCl-Lösung hinzugegeben und das Volumen mit Reinstwasser auf 50 mL aufgefüllt. Analog zu den Proben wurde ebenfalls ein Multielementenstandard (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) vorbehandelt und zur Kalibrierung des ICP-OES-Systems verwendet.

Bei der ICP-OES-Messung wurden die in den Proben enthaltenen Ionen in einem Plasma atomisiert und emittierten bei Wiederaufnahme von Elektronen elementenspezifische Wellenlängen, die mittels einer

CCD-Kamera erfasst wurden. Das hierfür verwendete System iCAP 6300 Duo der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Sunnyvale, USA) ermöglicht sowohl eine axiale als auch eine radiale Messung. Weitere Bestandteile des Systems waren ein konzentrischer Glaszerstäuber, eine Glaszyklon-Sprühkammer und ein 2 mm Bor-Quarz-Injektor. Als Spülgas wurde Stickstoff 5.0 und als Plasmagas wurde Argon 4.8 verwendet. Die Plasmaleistung betrug bei einem Zerstäubergasstrom von 0,50 L/min 1,35 kW (UV) bzw. bei einem Zerstäubergasstrom von 0,65 L/min 1,15 kW (Vis). Zum Spülen und während der Analyse wurde eine Pumprate von 50 U/min eingestellt. Für die drei analysierten Elemente ist die entsprechende Wellenlänge sowie der verwendete Messmodus in Tabelle 3.15 dargestellt.

Tabelle 3.15: Übersicht der mittels ICP-OES ermittelten Elemente mit zugehöriger Wellenlänge und Messmodus.

Element	Wellenlänge	Messmodus
Eisen	259,940 nm	axial
Magnesium	280,270 nm	radial
Zink	206,200 nm	axial

3.3.5 Bestimmung der Sporenkonzentration

Die Sporenkonzentration wurde mit einer Thoma-Zählkammer und einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss-Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen) bestimmt. Die Zählkammer bestand aus 4 x 4 Großquadraten, die sich in jeweils 4 x 4 Kleinquadrate unterteilten. Ein Kleinquadrat wies eine Fläche von 0,0025 mm² auf und die Kammertiefe betrug 0,02 mm. Vorbereitend wurden die Trägerstege der Zählkammer vorsichtig befeuchtet und das Deckgläschen aufgelegt, sodass newtonsche Ringe zu sehen waren. Anschließend wurde ein geringes Volumen der gut durchmischten Sporensuspension neben das Deckglas pipettiert, die durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gezogen wurde. Durch das Auszählen der Sporenanzahl von 16 Großquadraten konnte mittels Gleichung 3.1 die Sporenkonzentration bestimmt werden.

$$\text{Sporenkonzentration [Sporen/mL]} = \frac{\bar{n} \cdot 10^3}{A \cdot h} \quad (3.1)$$

- \bar{n} - Mittelwert der Sporenanzahl pro Kleinquadrat
- A - Fläche eines Kleinquadrats [mm²]
- h - Höhe der Zählkammer [mm]

3.3.6 Bestimmung der Biotrockenmasse

Um die Konzentration an Biotrockenmasse während einer Kultivierung zu bestimmen, wurde zum entsprechenden Kultivierungszeitpunkt der gesamte Inhalt eines Schüttelkolbenansatzes verwendet. Zur Separierung der darin enthaltenen Biomasse wurden zunächst weitere Feststoffe wie Calciumfumarat und CaCO_3 entfernt. Hierzu wurde der Inhalt des Schüttelkolbens in eine 1 L Laborflasche überführt, mit 600 mL Reinstwasser verdünnt und zum Lösen von Calciumfumarat bzw. Fumarsäure auf 80 °C in einem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden zum Abreagieren von noch vorliegendem CaCO_3 60 mL einer 5 %igen HCl-Lösung hinzugegeben. Nach der Durchmischung des Ansatzes bildete die Biomasse des Pilzes die einzigen festen Bestandteile innerhalb der Suspension. Zum Entfernen der Flüssigphase wurde der gesamte Ansatz in 1 L Zentrifugationsgefäße überführt und bei 5.400 rpm für 20 min zentrifugiert. Durch anschließendes Dekantieren wurde ein Großteil des Überstands verworfen und die restliche Flüssigkeit inklusive der Biomasse in 50 mL Reaktionsgefäße überführt. Durch Zentrifugation bei 8.500 rpm für 10 min sedimentierte die Biomasse vollständig am Boden der Reaktionsgefäße und konnte somit vom Überstand separiert werden. Zum Waschen der pelletierten Biomasse wurden in das Reaktionsgefäß 40 mL Reinstwasser gegeben, die Biomasse durch manuelles Durchmischen aufgelockert und erneut bei 8.500 rpm für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal wiederholt. Die gewaschene Biomasse wurde abschließend in einem getrockneten und ausgewogenen Porzellantiegel bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gravimetrisch analysiert.

3.3.7 Fluoreszenzfärbung von Biomasse mit Propidiumiodid

Um geschädigte Bereiche der Biomasse von *R. arrhizus* NRRL 1526 sichtbar zu machen, wurde eine Fluoreszenzfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Hierzu wurde die entsprechende Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben, mit 20 µL Propidiumiodid-Gebrauchslösung versetzt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Propidiumiodid-Gebrauchslösung wurde aus 40 µL Propidiumiodid-Lösung (0,5 mg/mL in Phosphat-Puffer) und 1200 µL Ringerlösung vor der Fluoreszenzfärbung frisch angesetzt. Zur Dokumentation wurde zunächst ein Bild im Phasenkontrast aufgenommen und danach mittels Auflicht und eines Fluoreszenzfilters (Filter-Set 09, Carl Zeiss AG, Oberkochen) eine Fluoreszenzaufnahme desselben Bildausschnitts gemacht. Durch Nebeneinanderlegen der beiden mikroskopischen Bilder konnte geschädigte Biomasse anhand von rot gefärbten Bereichen innerhalb der Fluoreszenzaufnahme identifiziert werden.

3.3.8 Dokumentation der Morphologie und Mikroskopie

In Abhängigkeit von der ausgebildeten Wachstumsform wurden während der Kultivierungen unterschiedliche Aufnahmemethoden zur Dokumentation der Morphologie angewendet.

Erfolgte das Wachstum in Form von Klumpen wurden ausschließlich makroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierzu wurde entweder die Unterseite des entsprechenden Schüttelkolbens bzw. die bewachsenen Reaktoreinbauten direkt fotografiert. Bei der Ausbildung von Pellet- und Mycel-Morphologie wurden dagegen sowohl makroskopische als auch mikroskopische Bilder aufgenommen. Um dabei die vorliegende Biomasse ohne weitere Feststoffpartikel darzustellen, wurden der

Kultivierung 2 mL gut durchmischte Probe entnommen und in ein Reagenzglas überführt. Anschließend wurden 8 mL Reinstwasser hinzugegeben und durch Zugabe von 5 %iger HCl-Lösung wurde das noch vorliegende CaCO_3 entfernt. Die makroskopische Dokumentation erfolgte durch direktes fotografieren der Biomassensuspension im Reagenzglas. Für mikroskopische Aufnahmen wurde eine repräsentative Probe der Biomassensuspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop Zeiss-Axioplan (Carl Zeiss AG, Oberkochen) angefertigt, das eine 50 - 400-fache Vergrößerung ermöglichte. Die Analyse der Bilder erfolgte über die Software analySIS pro 5.1 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg).

3.3.9 Bestimmung der Cellulaseaktivität

Zur Charakterisierung des Enzympräparats Biogazyme 2x wurde die Cellulaseaktivität (Filter Paper Unit) nach Ghose (1987) unter idealen Reaktionsbedingungen (50 °C, pH = 4,8) bestimmt. Des Weiteren wurde anhand der Cellulaseaktivität der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an Glucose und Fructose auf die Enzymaktivität untersucht.

Bei der Bestimmung der Cellulaseaktivität diente ein 1 x 6 cm großer Filterpapierstreifen (Whatman No.1) als Substrat, der gerollt in ein 1,5 mL Reaktionsgefäßen platziert wurde. Nach der Zugabe von 0,9 mL eines 50 mM Natriumcitratpuffers wurde der Ansatz bei 50 °C und 200 rpm für 10 min erhitzt (MKR13 Thermoschüttler, HLC Biotech, Bovenden). Anschließend wurden 0,1 mL einer Biogazyme 2x-Lösung (2 g/L Biogazyme 2x in 50 mM Natriumcitratpuffers) hinzugegeben und bei 50 °C, 200 rpm für 60 min inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurde das Reaktionsgefäß für 10 min in einem Wasserbad auf 100 °C erhitzt und somit die vorliegenden Enzyme denaturiert. Das nicht hydrolysierte Substrat und die denaturierten Enzyme wurden durch Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 5 min abgetrennt. Anhand des Überstands wurde die Konzentration an freigesetzten Glucoseäquivalenten mittels DNS-Reagenz quantifiziert (s. Kapitel 3.3.11). Zusätzlich wurden neben den Proben auch Glucosestandards, ein Substrat- und ein Enzymblank nach der zuvor beschriebenen Methode behandelt. Die Zusammensetzung der vier verschiedenen Ansätze ist in Tabelle 3.16 dargestellt.

Tabelle 3.16: Ansätze zur Bestimmung der Cellulaseaktivität von Biogazyme 2x.

Probe	Glucosestandard	Substratblank	Enzymblank
Filterpapierstreifen	1,0 mL Standard	Filterpapierstreifen	-
0,9 mL Puffer	-	1,0 mL Puffer	0,9 mL Puffer
0,1 mL Enzym-Lsg.	-	-	0,1 mL Enzym-Lsg.

Als Maß für die Cellulaseaktivität diente die Filter Paper Unit (FPU), die nach Ghose (1987) anhand der Konzentration an freigesetztem Glucoseäquivalent berechnet wurde. Die Einheit einer FPU ist in Gleichung 3.2 angegeben.

$$\text{FPU} = \left[\frac{\mu\text{mol}_{\text{Glucose}}}{(\text{mL} \cdot \text{min})} \right] \quad (3.2)$$

3.3.10 Bestimmung von Glucoseäquivalenten mittels DNS-Reagenz

Die Konzentrationsbestimmung der in Kapitel 3.3.10 freigesetzten Oligo- bzw. Monosaccharide basiert auf einer Reaktion der reduzierenden Enden der Saccharide mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS). Der bei dieser Reaktion gebildete Farbstoff 3-Amino-5-nitrosalicylsäure kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm detektiert werden. Da die Anzahl der während der enzymatischen Hydrolyse freigesetzten Saccharide mit der Anzahl an reduzierenden Enden korreliert, ist somit eine Quantifizierung der Glucoseäquivalente möglich (Miller, 1959).

Hierzu wurden 200 µL Probenüberstand bzw. Glucosestandard, Substrat- oder Enzymblank mit 400 µL DNS-Reagenz in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und für 5 min in einem Wasserbad auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Reaktionsansätze in einem Eisbad wurden jeweils 200 µL in ein Well einer 96-Well Mikrotiterplatte gegeben und in einem Photometer (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg) die Extinktion bei 540 nm bestimmt. Proben die eine Extinktion von > 1,0 aufwiesen, wurden mit Reinstwasser verdünnt. Die Berechnung der Konzentration an Glucose-äquivalenten erfolgte anhand der ebenfalls vermessen Glucosestandards und nach Abzug der Blanks. In Tabelle 3.17 ist die Zusammensetzung der DNS-Reagenz dargestellt.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung der DNS-Reagenz nach Ghose (1987).

Komponente	Menge
3,5-Dinitrosalicylsäure	1,77 g
NaOH	3,37 g
gelöst in Reinstwasser	236 mL
Na-K-Tartarat	68,55 g
Na-Metabisulfit	1,38 g

3.4 Datenauswertung

Ausbeute

Die Ausbeute berechnet sich aus der erzielten Produktkonzentration an Fumarsäure bezogen auf die bis dahin verbrauchte Konzentration an Substrat und wird durch den Produktausbeutekoeffizienten beschrieben (s. Gleichung 3.3).

$$Y_{P/S} = \frac{c_{FA_t}}{c_{S_0} - c_{S_t}} \quad (3.3)$$

- $Y_{P/S}$ - Produktausbeutekoeffizient [g/g]
- c_{FA_t} - Fumarsäurekonzentration zum Zeitpunkt t [g/L]
- c_{S_0} - Ausgangskonzentration des Substrats [g/L]
- c_{S_t} - Substratkonzentration zum Zeitpunkt t [g/L]

Produktivität

Die Produktivität berechnet sich aus dem Quotienten der gebildeten Konzentration an Fumarsäure und dem dafür benötigten Kultivierungszeitraum (s. Gleichung 3.4). Als maximale Produktivität wird hierbei die Produktivität bezeichnet, die zwischen zwei Probenahmen den höchsten Wert annimmt.

$$Pr = \frac{c_{FA_t} - c_{FA_0}}{\Delta t} \quad (3.4)$$

- Pr - Produktivität [g/(L·h)]
- c_{FA_t} - Fumarsäurekonzentration zum Zeitpunkt t [g/L]
- c_{FA_0} - Ausgangskonzentration von Fumarsäure [g/L]
- Δt - Kultivierungszeitraum [h]

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Produktion von Fumarsäure auf Basis von Glucose

Um für die biotechnologische Produktion von Fumarsäure ein effektives Herstellungsverfahren zu entwickeln, wurde zunächst auf Basis des Substrats Glucose eine systematische Medien- und Prozessoptimierung durchgeführt. Anschließend wurden auf Grundlage der dabei gewonnenen Erkenntnisse insgesamt drei unterschiedliche Prozessstrategien entwickelt und spezifische Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren charakterisiert.

4.1.1 Reproduktion der Kultivierung nach Ling und Ng (1989)

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines effizienten Prozesses zur Produktion von Fumarsäure wurde das Patent von Ling und Ng (1989) verwendet. In dieser Publikation wurden die bisher höchsten Endkonzentrationen an Fumarsäure, bei sehr hohen Ausbeuten und Produktivitäten, beschrieben. Hierzu wurden zunächst mit dem filamentösen Schimmelpilz *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 Sporen auf festem Agar-Medium produziert. In einem zweiten Schritt wurde in einer Vorkultur durch Animpfen des Mediums mit Sporen über einen Zeitraum von 18 - 24 h Biomasse aufgebaut. Diese diente anschließend zur Inokulation eines 3 L Fermenters, in dem die Produktion von Fumarsäure erfolgte (Ling und Ng, 1989).

Basierend auf dieser Kultivierungsstrategie wurde zunächst mit Agar-Medium A eine Sporensuspension hergestellt. Hierzu wurden 60 µL einer Kryokultur auf einer Agarplatte mit Medium A ausplattiert und für 6 - 7 d bei 34 °C inkubiert (s. Abbildung 4.1). Innerhalb dieses Zeitraums bildete der Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 zunächst eine weiße Mycelstruktur aus, die die Agarplatte vollständig bedeckte. Bei einsetzender Sporulation verfärbte sich das ausgebildete Hyphengeflecht bräunlich und unter dem Mikroskop konnte die Bildung von Sporangien dokumentiert werden. Nach vollständiger Braunfärbung des Mycels wurde durch Zugabe von 0,9 %iger NaCl-Lösung eine Sporensuspension hergestellt, die zum Animpfen der Vorkultur verwendet wurde.

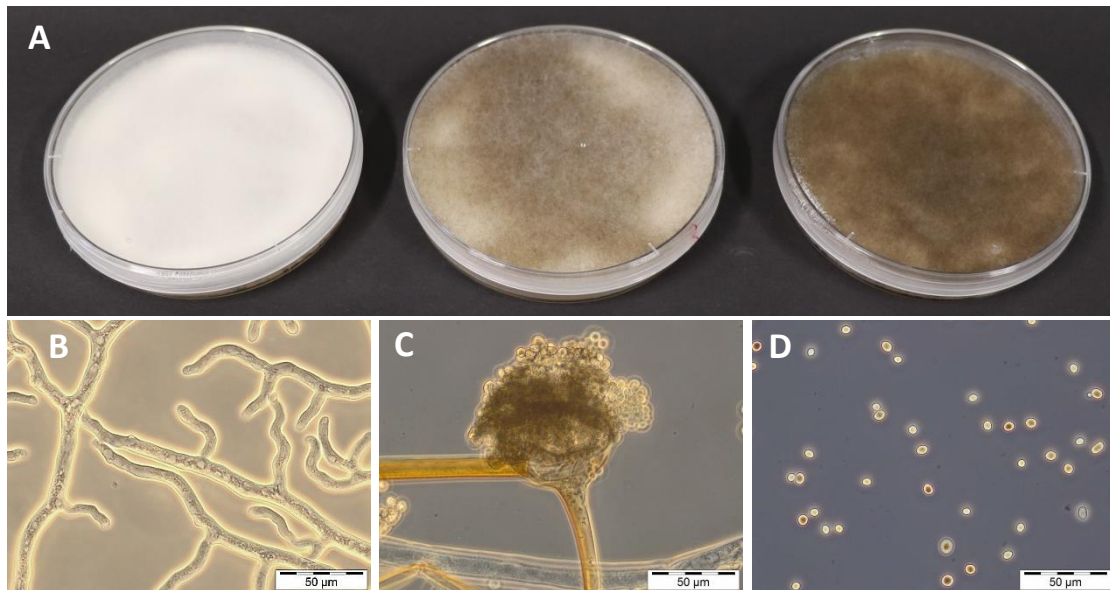


Abbildung 4.1: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Herstellung von Sporensuspension mit Medium A bei 34 °C über 7 d; A - makroskopische Veränderung der Morphologie während der Sporenproduktion, B - mikroskopische Aufnahme des Hyphenwachstums, C - Sporangium, D - Sporen in Suspension.

Für die anschließende Vor- und Hauptkultur wurden allgemeine Prozessparameter wie die Zusammensetzung der beiden Medien und die Temperatur übernommen. Abweichend zur Vorschrift von Ling und Ng (1989) wurde die Hauptkultur zur Produktion von Fumarsäure in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 200 rpm durchgeführt. Der erzielte Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

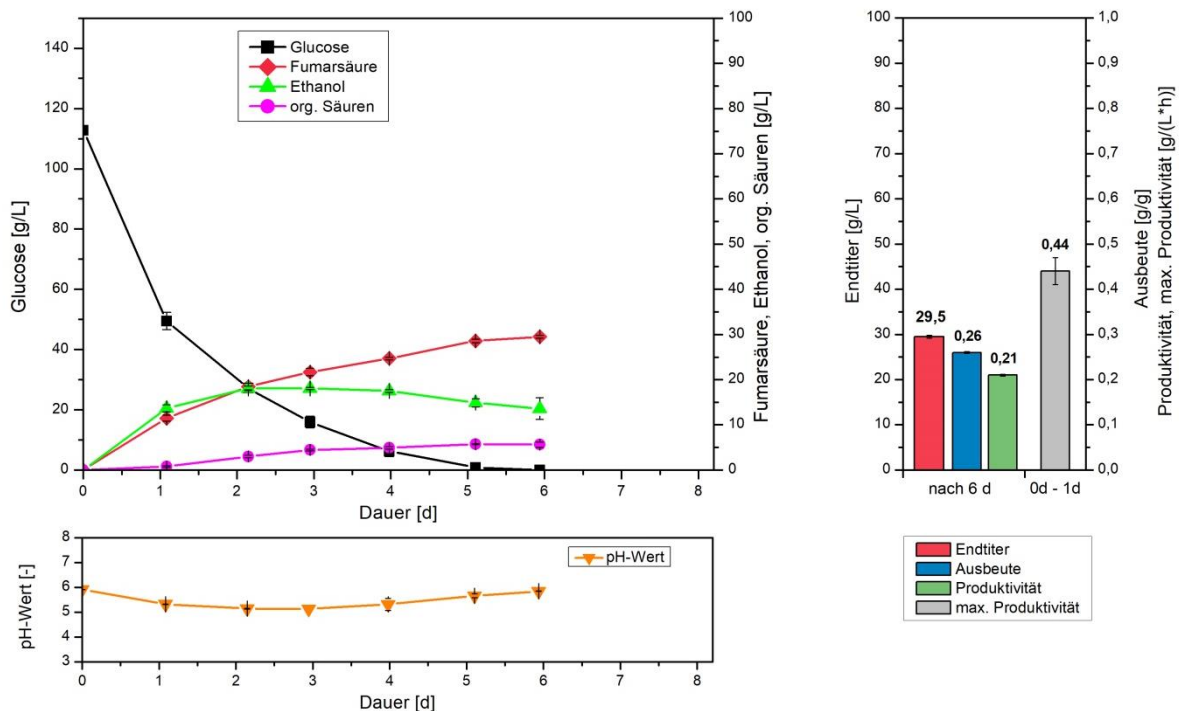


Abbildung 4.2: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 nach Ling und Ng (1989) mit 10 % (v/v) Vorkultur und Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 1 von Roth); Vorkultur mit Medium B in 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen bei 32 °C, 200 rpm, über 20 h.

Die Kultivierung mit der Prozessstrategie nach Ling und Ng (1989) ermöglichte im Schüttelkolben die Produktion von 29,5 g/L Fumarsäure innerhalb von 6 d. Unter vollständigem Glucoseverbrauch entspricht dies einer Ausbeute von 0,26 g/g bei einer Produktivität von 0,21 g/(L·h). Mit 0,44 g/(L·h) wies der Prozess innerhalb der ersten 24 h die maximale Produktivität zwischen zwei Probenahmen auf. In diesem Zeitraum wurde ebenfalls die höchste Abnahme an Glucose detektiert, die im weiteren Kultivierungsverlauf rückläufig war. Bezogen auf die Bildung von Nebenprodukten konnte in geringen Konzentrationen die Produktion von Äpfelsäure und Bernsteinsäure nachgewiesen werden, die als organische Säuren summiert wurden und mit 5,7 g/L nach 5 d ein Maximum erreichten. Als Hauptnebenprodukt wurde innerhalb der ersten 2 d die Bildung von 18,1 g/L Ethanol festgestellt. Dabei deutet die Akkumulation von Ethanol auf Sauerstoff limitierende Bedingungen innerhalb des Kultivierungssystems hin. Als mögliche Ursache hierfür kann die erzielte Morphologie angeführt werden (s. Abbildung 4.3). So lag der Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 nach 20 h Vorkultur hauptsächlich als loses Mycel vor und wies nur vereinzelt die Bildung von Pellets auf. In der Hauptkultur bildete *R. arrhizus* dagegen dichte Pellets aus, die einen Durchmesser von > 1 mm aufwiesen. Durch diese Form an kompakter Biomasse entstehen anaerobe Bedingungen im Inneren der Pellets, die die Produktion von Ethanol begünstigen und die Produktion von Fumarsäure negativ beeinflussen (Roa Engel et al., 2011).

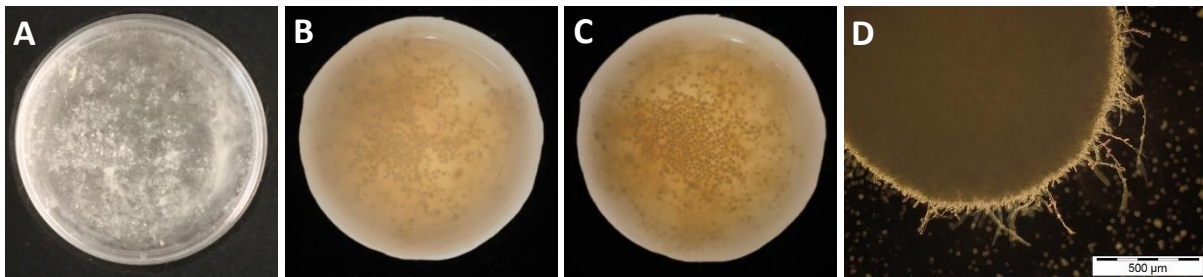


Abbildung 4.3: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung nach Ling und Ng (1989); A - Aufnahme der Vorkultur nach 20 h, mit Medium B in 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen bei 32 °C und 200 rpm, B - Aufnahme der Hauptkultur nach 1 d, mit Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C und 200 rpm, C und D - Aufnahme der Hauptkultur nach 4 d.

Ein Vergleich der hier gezeigten Kultivierung mit der Publikation von Ling und Ng (1989) zeigt deutlich, dass sowohl der hohe Endtiter an Fumarsäure von 135,3 g/L als auch die Ausbeute von 1,04 g/g und die Produktivität von 1,77 g/(L·h) nicht erreicht werden konnten. Eine direkte Adaption des Kultivierungssystems in Schüttelkolben war somit nicht möglich. Im Folgenden wurde daher der Einfluss von verschiedenen Kultivierungsparametern auf die Produktion von Fumarsäure untersucht und gegebenenfalls angepasst.

4.1.2 Optimierung der Kultivierung nach Ling und Ng (1989)

Die nach Ling und Ng (1989) durchgeführte Kultivierung (s. Kapitel 4.1.1) zeigte, dass die Produktion von Fumarsäure in Schüttelkolben prinzipiell möglich ist. Im Hinblick auf einen möglichst effizienten Prozess ist allerdings eine deutliche Steigerung der allgemeinen Prozessgrößen, wie die Endkonzentration an Fumarsäure, Ausbeute und Produktivität sowie eine Reduktion der Konzentration an Nebenprodukten notwendig. Daher wurde in den folgenden Kapiteln der Einfluss von verschiedenen Prozessparametern untersucht. Bei einer Verbesserung des Kultivierungssystems wurde die vorgenommene Veränderung für weitere Optimierungsschritte übernommen.

4.1.2.1 Einfluss von Komplexmedienbestandteilen

Komplexmedienbestandteile wie Maisquellwasser oder Hefeextrakt sind Zusätze, die Kultivierungsmedien beigesetzt werden, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verbessern und die Produktion von Metaboliten zu fördern. Sie enthalten unterschiedliche Konzentrationen an Peptiden, Aminosäuren, Vitaminen, Nukleotiden und verschiedene Spurenelemente (Klotz, 2017).

In der Kultivierungsstrategie von Ling und Ng (1989) werden sowohl im Medium der Vorkultur als auch in der Hauptkultur 0,5 mL/L Maisquellwasser eingesetzt. Um den Einfluss dieses Komplexmedienbestandteils auf die Produktion von Fumarsäure zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Konzentrationen an Maisquellwasser (0,1 - 1,0 mL/L) in der Vor- und Hauptkultur eingesetzt. Da diese Variationen keine Steigerungen in der Produktion von Fumarsäure ergaben, wurde in einem zweiten Schritt Maisquellwasser durch Hefeextrakt substituiert und der Einfluss von 0,1 - 1,0 g/L Hefeextrakt im Vor- und Hauptkulturmedium untersucht. Innerhalb dieser Versuchsreihe lieferte die Kultivierung mit 0,1 g/L Hefeextrakt das beste Ergebnis. Die Kultivierung erfolgte in Einzelbestimmung und ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

Durch die Substitution von Maisquellwasser mit Hefeextrakt und einer Reduktion der eingesetzten Konzentration auf 0,1 g/L Hefeextrakt konnte der Endtiter von Fumarsäure auf 34,4 g/L erhöht werden. Dies entspricht einer Steigerung von 17 %, im Vergleich zur Kultivierung mit 0,5 mL/L Maisquellwasser (vgl. Abbildung 4.2). Außerdem konnte die maximal produzierte Menge an Ethanol auf 14,0 g/L reduziert werden. Morphologisch betrachtet wuchs der Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 in der Vorkultur weiterhin in zwei Wachstumsformen. So traten neben losem Mycel (s. Abbildung 4.5, B) auch kompakte Pellets auf (s. Abbildung 4.5, C). Auch in der Hauptkultur konnten diese zwei Formen der Morphologie wieder gefunden werden. Neben Pellets ist in Abbildung 4.5, D das leicht agglomerierte Mycel anhand von dunkleren Bereichen im Medium zu erkennen. Diese Beobachtung stellt im Vergleich zur Kultivierung mit 0,5 mL/L Maisquellwasser eine Veränderung dar, in der die kompakte Pellet-Morphologie dominierte (vgl. Kapitel 4.1.1).

Ergebnisse und Diskussion

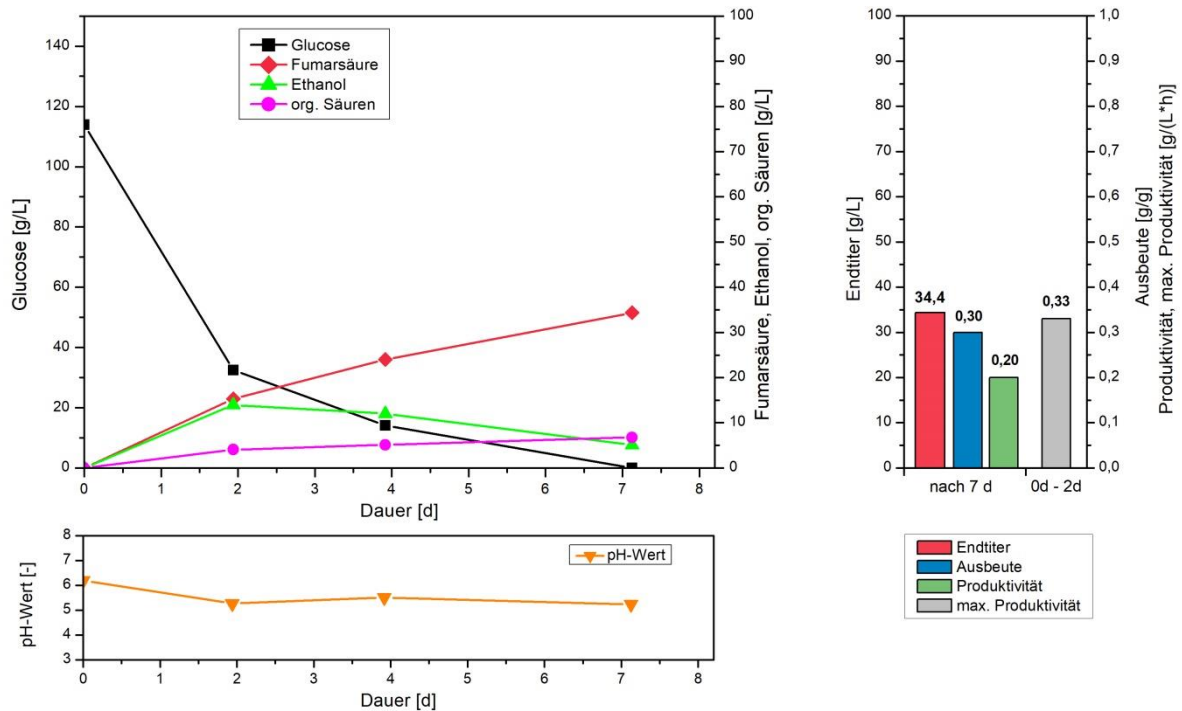


Abbildung 4.4: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und Medium C (0,1 g/L Hefeextrakt) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 1 von Roth); Vorkultur mit Medium B (0,1 g/L Hefeextrakt) in 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen bei 32 °C, 200 rpm, über 18 h.

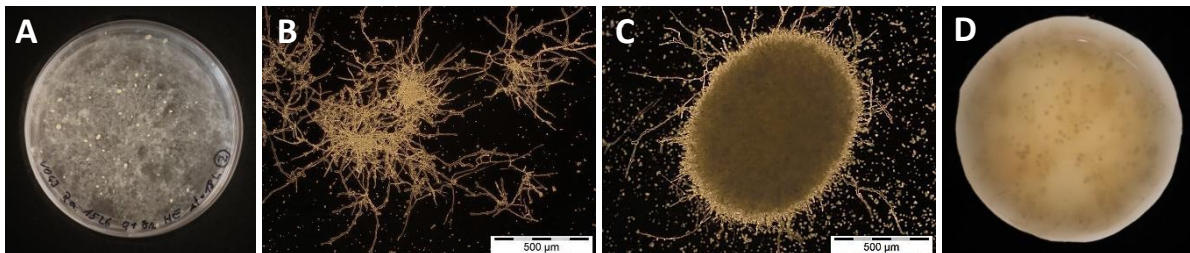


Abbildung 4.5: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit 0,1 g/L Hefeextrakt; A, B und C - Aufnahme der Vorkultur nach 18 h, mit Medium B (0,1 g/L Hefeextrakt) in 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen bei 32 °C und 200 rpm, D - Aufnahme der Hauptkultur nach 2 d, mit Medium C (0,1 g/L Hefeextrakt) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C und 200 rpm.

Im Rahmen der Kultivierungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Hefeextrakt wurde zusätzlich eine Vorkultur ohne den Zusatz von Komplexmedienbestandteilen durchgeführt. Dabei ermöglichte dieser Ansatz eine Kultivierung mit einem genau definierten Minimalmedium. Die erzielte Morphologie nach 18 h Vorkultur ist in Abbildung 4.6 dargestellt und wies, im Gegensatz zu Vorkulturen mit Komplexmedienbestandteilen, fast ausschließlich Mycel-Morphologie auf. Diese Beobachtung stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um potenziell der Bildung von großen, kompakten Pellets in der Hauptkultur entgegenzuwirken und somit das Produktionsverhalten zu verbessern. Ergänzend hierzu wurde bereits in mehreren aktuellen Publikationen der Aufbau von Biomasse und die Produktion von Fumarsäure mittels Minimalmedien beschrieben (Yu et al., 2012; Wang et al., 2013; Das et al., 2016b). So konnte beispielsweise in Wang et al. (2013) mittels Vor- und Hauptkultur ohne Komplexmedienbestandteile eine Kultivierung durchgeführt werden, die die Produktion von 56,5 g/L Fumarsäure, bei Ausbeuten von 0,71 g/g und Produktivitäten von 0,67 g/(L·h) ermöglichte. Für eine

weitere Optimierung des Kultivierungssystems wurde daher auf die Zugabe von Komplexmedienbestandteilen verzichtet und in folgenden Versuchen ein definiertes Minimalmedium verwendet.

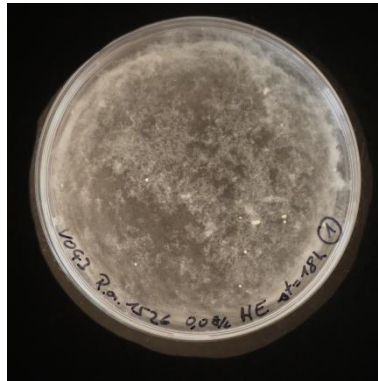


Abbildung 4.6: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Vorkultur mit Medium B (ohne Komplexmedienbestandteile) in 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen bei 32 °C und 200 rpm, nach 18 h.

4.1.2.2 Einfluss der Vorkultur und Art des Calciumcarbonats

Die separate Produktion von Biomasse in einer Vorkultur, gefolgt von einer Hauptkultur zur Akkumulation des gewünschten Produkts, ist eine gängige Strategie in biotechnologischen Prozessen. Im Hinblick auf eine grundlegende Optimierung des Kultivierungssystems zur Produktion von Fumarsäure erschwert allerdings das komplexe Zusammenspiel aus Prozessparametern der Vorkultur und deren Einfluss auf die anschließende Hauptkultur, das Identifizieren von vielversprechenden Optimierungsansätzen. So haben beispielsweise allgemeine Prozessparameter wie die Größe von Schüttelkolben, die Schüttelgeschwindigkeit, die Kultivierungstemperatur oder die Zusammensetzung des Mediums einen großen Einfluss auf die Morphologie in der Vorkultur und somit auch auf das Kultivierungsergebnis der Hauptkultur (Zhou et al., 2011; Papadaki et al., 2017).

Um die Anzahl an möglichen Optimierungsparametern zu reduzieren und somit das Kultivierungssystem zu vereinfachen, wurde eine Kultivierung ohne separate Vorkultur durchgeführt. Hierzu wurde das Hauptkulturmedium, ohne Komplexmedienbestandteile, direkt mit Sporensuspension (10^5 Sporen/mL) inokuliert. Die Kultivierung erfolgte in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen, bei 34 °C und 200 rpm. Zur Regulierung des pH-Wertes wurde wie in den vorherigen Kultivierungen 50 g/L Calciumcarbonat (Typ 1 von Roth) verwendet. Der erzielte Kultivierungsverlauf und die entsprechende Morphologie sind in Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

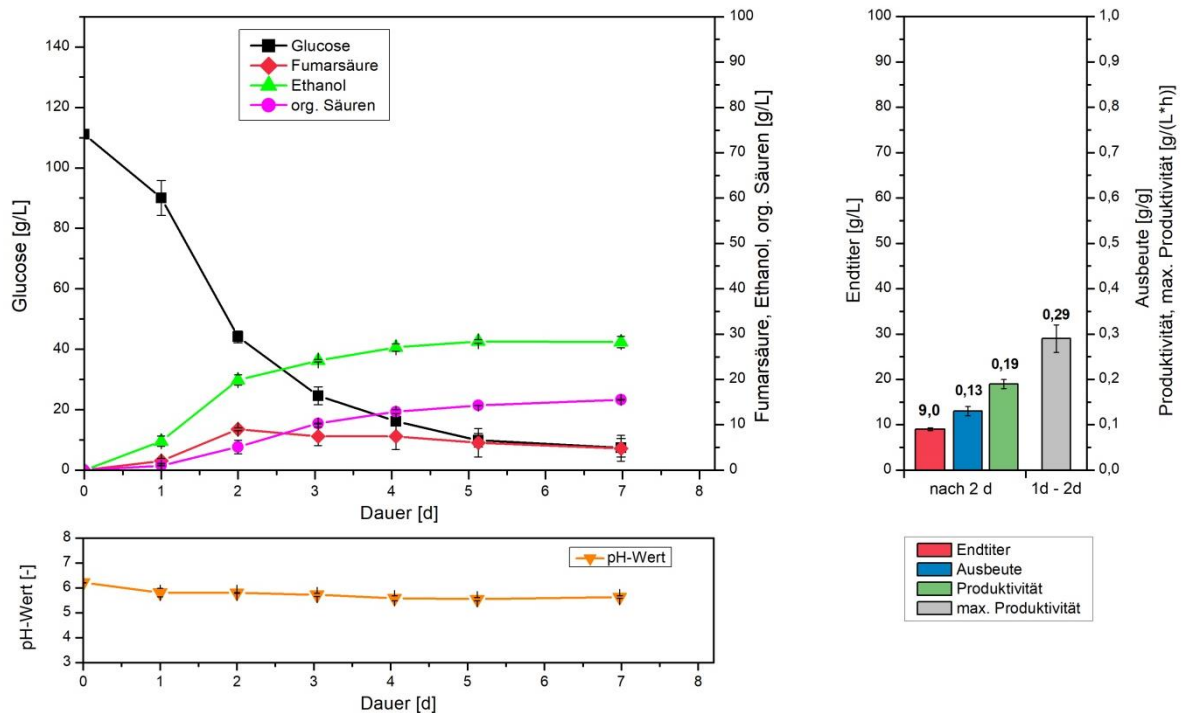


Abbildung 4.7: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 1 von Roth).

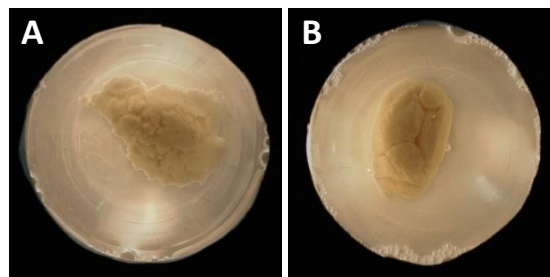


Abbildung 4.8: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und 50 g/L CaCO₃ (Typ 1 von Roth); A - Aufnahme der Hauptkultur nach 1 d, mit Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C und 200 rpm, B - Aufnahme der Hauptkultur nach 3 d.

Das erzielte Ergebnis der Kultivierung zeigte eine deutliche Verschlechterung der Produktionseigenschaften. So wurde nach einer Kultivierungsdauer von 2 d eine maximale Fumarsäurekonzentration von lediglich 9,0 g/L, bei einer Ausbeute von 0,13 g/g erreicht. Im weiteren Verlauf wurde unter weiterer Abnahme der Glucosekonzentration eine Reduktion von Fumarsäure auf 4,8 g/L nach 7 d beobachtet. Bezogen auf die Bildung von Nebenprodukten konnte nach 7 d eine Konzentration an anderen organischen Säuren von 15,5 g/L und 28,3 g/L Ethanol festgestellt werden. Diese, im Vergleich zu vorherigen Kultivierungen, deutlich erhöhten Werte können mit der auftretenden Morphologie erklärt werden. So lag die Biomasse von *R. arrhizus* NRRL 1526 bereits nach einer Kultivierungsdauer von 1 d als ein kompakter Klumpen vor, dessen Kompaktheit im weiteren Verlauf zunahm (vgl. Abbildung 4.8, A und B). Neben der Zusammenlagerung der vorliegenden Biomasse wurde außerdem das vorgelegte Calciumcarbonat vollständig im Klumpen eingeschlossen, sodass das Kultivierungsmedium klar erschien. Problematisch ist bei dieser Form der Morphologie ein ungünstiges Oberflächen/Volumen-Verhältnis, das keine ausreichende Sauerstoff- und Substratversorgung im Inneren des Klumpens zulässt. Somit können anhand der dort vorliegenden anaeroben Bedingungen die

hohe Konzentration an Ethanol und die geringe Produktion von Fumarsäure erklärt werden (Roa Engel et al., 2011; Zhang et al., 2015).

Um bei Kultivierungen mit direkter Sporeninokulation die Bildung von Klumpen zu verhindern, wurde in einem weiteren Versuch der Hersteller des eingesetzten Calciumcarbonats geändert. Hierzu wurden zunächst in Voruntersuchungen die zwei unterschiedlichen Arten von Calciumcarbonat mikroskopisch charakterisiert. Dabei wies das alternativ verwendete Calciumcarbonat von VWR (Typ 2) im Gegensatz zu Calciumcarbonat von Roth (Typ 1) unter dem Mikroskop eine deutlich geringere Partikelgröße auf (vgl. Abbildung 4.9, A und C). Zusätzlich konnte qualitativ ein unterschiedliches Agglomerationsverhalten der Feststoffpartikel untereinander festgestellt werden (vgl. Abbildung 4.9, B und D).

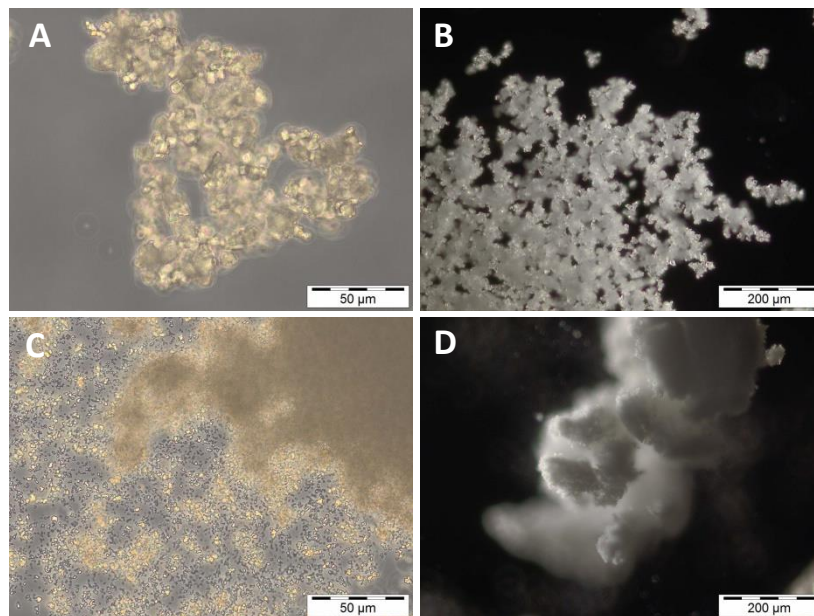


Abbildung 4.9: Mikroskopische Aufnahmen von Calciumcarbonat; A und B - CaCO_3 von Roth (Typ 1), C und D - CaCO_3 von VWR (Typ 2).

In Abbildung 4.10 ist der Verlauf der Kultivierung mit 50 g/L des alternativen Calciumcarbonats (Typ 2 von VWR) dargestellt. Anhand des Kultivierungsverlaufes kann innerhalb der ersten 24 h das Auftreten einer lag-Phase aufgezeigt werden, in der unter geringem Glucoseverbrauch weder Fumarsäure noch andere Nebenprodukte gebildet wurden. Im Zeitraum zwischen dem ersten und zweiten Tag konnte dagegen unter hohem Glucoseverbrauch mit 0,59 g/(L·h) die maximale Produktivität an Fumarsäure detektiert werden. Im weiteren Kultivierungsverlauf nahm die Konzentration an Fumarsäure weiter zu und erreichte nach 7 d einen Endtiter von 51,0 g/L. Dies entspricht bei vollständiger Verstoffwechslung von Glucose einer Ausbeute von 0,46 g/g und einer Produktivität von 0,30 g/(L·h). Bezogen auf den pH-Wert konnte zu Beginn der Kultivierung ein initialer Wert von 7,8 festgestellt werden. Im Vergleich zur Kultivierung mit Calciumcarbonat von Roth (Typ 1) lag somit ein höherer pH-Wert zu Beginn der Kultivierung vor (vgl. Abbildung 4.7). Im weiteren Kultivierungsverlauf nahm der pH-Wert ab und erreichte nach 2 d einen konstanten Wert von 6,2. Aufgrund der hohen Menge an produzierter Fumarsäure konnte im Zeitraum zwischen 3 d und 5 d das vollständige Aufbrauchen des eingesetzten Calciumcarbonats festgestellt werden. Erkennbar ist dies anhand des Abfallens des pH-Wertes auf einen finalen Wert von 3,5 nach 7 d. Ein weiterer Unterschied zur Kultivierung mit Calciumcarbonat von Roth (Typ 1) konnte in der Akkumulation von Ethanol festgestellt werden. So erreichte die Konzentration an

Ethanol nach 2 d ein Maximum von 13,4 g/L. Ab diesem Zeitpunkt wurde ein kontinuierlicher Rückgang an Ethanol bis auf eine finale Konzentration von 1,5 g/L nach 7 d detektiert.

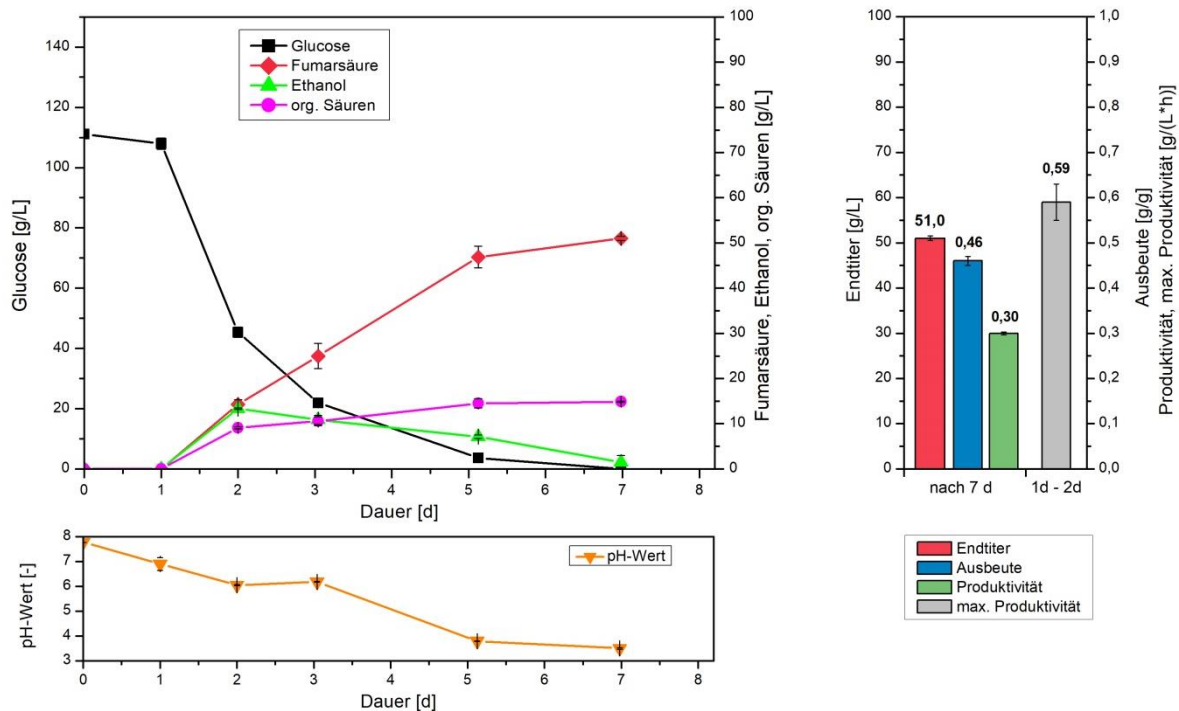


Abbildung 4.10: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR).

Als Grund für die deutlich verbesserten Produktionseigenschaften kann die aufgetretene Morphologie angeführt werden. So konnte durch Aufnahme der Unterseite der Schüttelkolben weder das Vorliegen von Klumpen noch von Pellets beobachtet werden (s. Abbildung 4.11, A und B). Dagegen konnte nach Verdünnen einer Probe des Kultivierungsansatzes mit Wasser und Ansäuern mit 5 %iger Salzsäure, das Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 in Form von losem Mycel dokumentiert werden (s. Abbildung 4.11, C). Dabei ermöglicht diese Art der Morphologie im Gegensatz zu großen Pellets oder Klumpen eine ausreichende Substratversorgung der vorliegenden Biomasse und erklärt somit die Verbesserung des Produktionssystems (Papadaki et al., 2017).

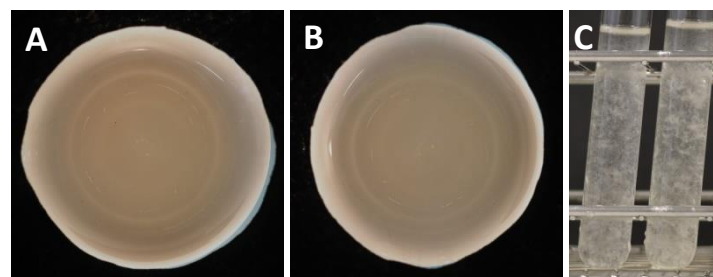


Abbildung 4.11: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); A - Aufnahme der Hauptkultur nach 1 d, mit Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C und 200 rpm, B und C - Aufnahme der Hauptkultur nach 3 d.

Zusammenfassend konnte innerhalb dieses Kapitels durch das Weglassen der Vorkultur das Kultivierungssystem deutlich vereinfacht werden. Weitergehend konnte durch einen Wechsel des

Herstellers von Calciumcarbonat erfolgreich eine Kultivierung mit Mycel-Morphologie durchgeführt werden, die eine Steigerung der Produktion an Fumarsäure ermöglichte. Ergänzend hierzu zeigte eine mikroskopische Untersuchung des Calciumcarbonats, dass die Partikelgröße des eingesetzten Calciumcarbonats maßgeblich die auftretende Morphologie beeinflusste. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen und den möglichen Einfluss von potenziellen Verunreinigungen innerhalb des Calciumcarbonat-Feststoffs auszuschließen, wurden weitere Untersuchungen angestellt. Da diese Versuche nach Beendigung der Medienoptimierung durchgeführt wurden, werden sie separat in Kapitel 4.1.2.8 diskutiert.

4.1.2.3 Einfluss von Weinsäure

Bei Weinsäure, auch Tartarsäure genannt, handelt es sich um eine gesättigte Dicarbonsäure. Im Kultivierungsmedium von Ling und Ng (1989) wurde Weinsäure in einer sehr geringen Konzentration von 0,0075 g/L eingesetzt. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass neben Ling und Ng (1989) keine weitere Publikation gefunden wurde, die Weinsäure als Medienzusatz verwendet. Um die prinzipielle Notwendigkeit von Weinsäure zur Produktion von Fumarsäure zu untersuchen, wurde eine Kultivierung mit 0,0075 g/L und eine Kultivierung ohne Zugabe von Weinsäure durchgeführt und die Ergebnisse in Abbildung 4.12 vergleichend dargestellt.

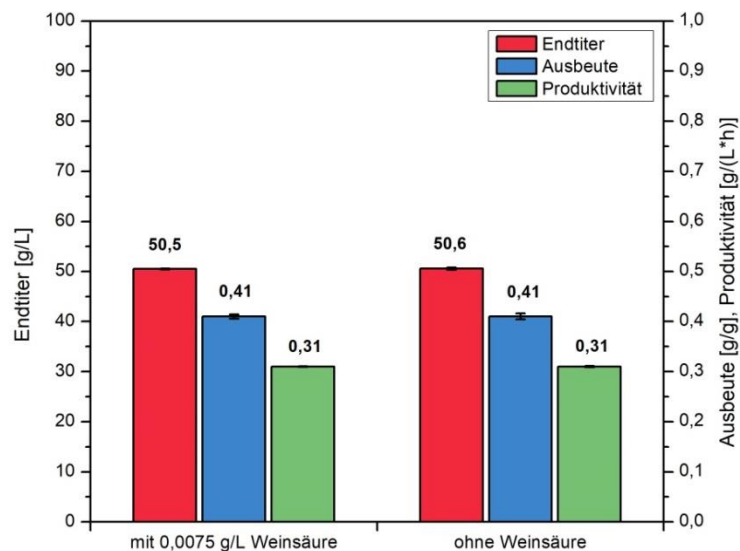


Abbildung 4.12: Einfluss von Weinsäure auf die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); Kultivierungsergebnis mit 0,0075 g/L Weinsäure und ohne Weinsäure nach 7 d.

Die vergleichende Darstellung zeigt, dass in beiden Ansätzen nach 7 d eine identische Konzentration an Fumarsäure von ca. 50,5 g/L, bei einer Ausbeute von 0,41 g/g und Produktivität von 0,31 g/(L·h) erreicht wurde. Somit ist eine Zugabe von 0,0075 g/L Weinsäure zur Produktion von Fumarsäure nicht notwendig. In folgenden Kultivierungen wurde Weinsäure dem Medium daher nicht mehr hinzugefügt.

4.1.2.4 Einfluss der Sporenkonzentration

Um den Einfluss der initialen Sporenkonzentration bei direkter Inokulation der Hauptkultur zu untersuchen, wurde neben der bisher verwendeten Konzentration von 10^5 Sporen/mL ebenfalls 10^4 und 10^6 Sporen/mL eingesetzt. Das Ergebnis dieser Kultivierungen ist vergleichend in Abbildung 4.13 dargestellt.

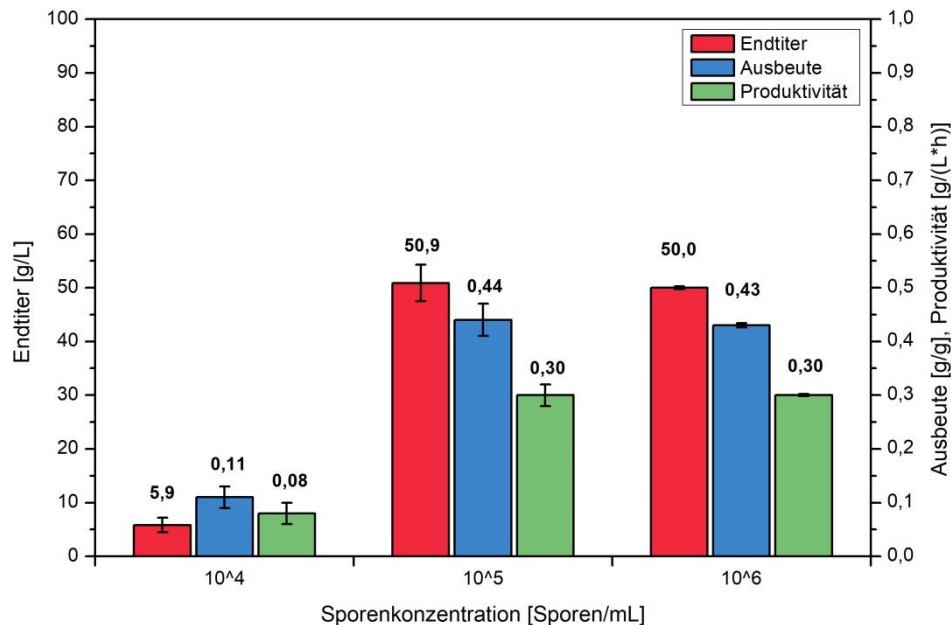


Abbildung 4.13: Einfluss der initialen Sporenkonzentration auf die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); Kultivierungsergebnis mit 10^4 Sporen/mL nach 3 d, bei 10^5 und 10^6 Sporen/mL nach 7 d.

Die Kultivierungen bei einer initialen Sporenkonzentration von 10^5 und 10^6 Sporen/mL lieferten unter Mycel-Morphologie ein identisches Ergebnis. So konnte bei beiden Ansätzen nach einer Dauer von 7 d die Produktion von ca. 50 g/L Fumarsäure bei einer Ausbeute von 0,44 bzw. 0,43 g/g beobachtet werden. Bei einer eingesetzten Sporenkonzentration von 10^4 Sporen/mL bildete die Biomasse von *R. arrhizus* NRRL 1526 dagegen einen kompakten Klumpen aus, der eine effektive Produktion von Fumarsäure verhinderte. So konnte nach 3 d eine maximale Konzentration von lediglich 5,9 g/L Fumarsäure detektiert werden.

Anhand dieser Versuchsreihe kann somit abgeleitet werden, dass ein Grenzwert der initialen Sporenkonzentration von 10^5 Sporen/mL, im Hinblick auf eine gute Morphologie, nicht unterschritten werden sollte. Eine Erhöhung dieses Wertes ermöglicht allerdings keine Verbesserung der Produktionseigenschaften. Ein Vergleich dieses Ergebnisses mit Literaturangaben zeigt, dass bei Kultivierungen zur Produktion von Fumarsäure durchaus der Einsatz von höheren Sporenkonzentrationen üblich ist. So setzten Riscaldati et al. (2000), Zhou et al. (2011) und Das et al. (2015b) eine Sporenkonzentration von 10^6 Sporen/mL zum Animpfen der Vorkultur ein. Mit 10^7 Sporen/mL verwendeten Fu et al. (2010), Ding et al. (2011) und Gu et al. (2014) die höchste in der Literatur beschriebene Sporenkonzentration zum Animpfen von Kultivierungen ein. Für eine weitere Optimierung des Kultivierungssystems wurde in dieser Arbeit an der bisherigen initialen Sporenkonzentration von 10^5 Sporen/mL festgehalten.

4.1.2.5 Einfluss durch die Charge und das Alter der Sporensuspension

Bis zu diesem Zeitpunkt der Prozessoptimierung wurde der Charge und dem Alter der Sporensuspension keine entscheidende Bedeutung zugeordnet. Vielmehr wurde angenommen, dass Sporen unabhängig von ihrer Produktionscharge und Lagerungsdauer eine gleichbleibende Qualität aufweisen und somit nur die Konzentration an Sporen das Kultivierungsergebnis beeinflusst.

Bei einer Kultivierung mit einer neuen Charge an Sporensuspension zeigte sich allerdings, dass ohne eine Veränderung des Kultivierungssystems eine Steigerung der Produktion an Fumarsäure möglich war. Der Verlauf der entsprechenden Kultivierung ist Abbildung 4.14 dargestellt.

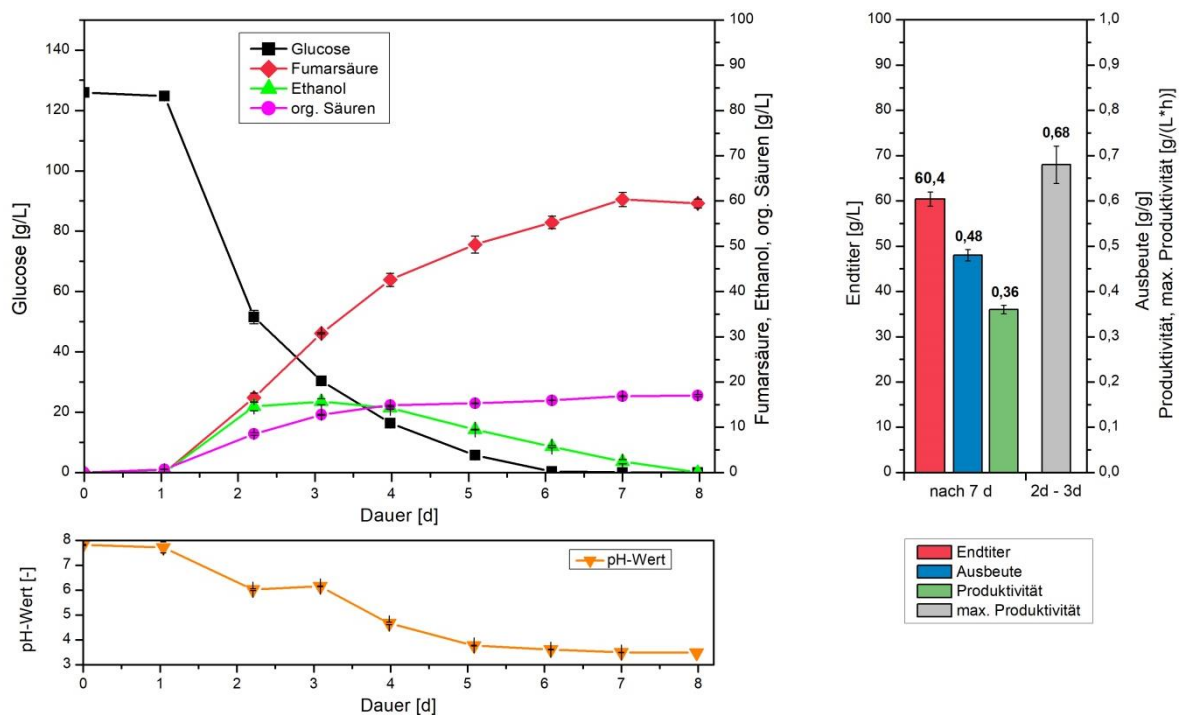


Abbildung 4.14: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation (neue Charge an Sporensuspension) und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR).

Unter Verwendung der neuen Sporensuspension konnte bei einer initialen Glucosekonzentration von 126,0 g/L die Produktion von 60,4 g/L Fumarsäure nach 7 d detektiert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,48 g/g bei einer Produktivität von 0,36 g/(L·h). Im Vergleich zu Kultivierungen mit der zuvor eingesetzten Sporensuspension konnte somit eine Steigerung der Ausbeute um 9 % bzw. 20 % in Bezug auf die Produktivität beobachtet werden (vgl. Kapitel 4.1.2.4). Da neben der Charge an Sporensuspension keine Änderung an Prozessparametern vorgenommen wurde, konnte anhand dieser Kultivierung der Einfluss durch die Sporencharge belegt werden. Bei der Herstellung von weiteren Sporensuspensionen wurden daher zunächst die Produktionseigenschaften in einer Referenzkultivierung überprüft. Zusätzlich wurde durch eine maximale Verwendungsdauer der Sporensuspension von 6 Wochen einer Qualitätsabnahme durch das Altern der Sporen vorgebeugt.

4.1.2.6 Einfluss von Spurenelementen

Das Kultivierungsmedium nach Ling und Ng (1989) enthält die drei Spurenelemente Magnesium, Zink und Eisen, die essentiell für den zellulären Metabolismus sind und in verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugesetzt werden (0,40 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,044 g/L $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,0075 g/L $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$). Um den Einfluss der Konzentration jedes dieser Spurenelemente zu untersuchen, wurden Kultivierungen durchgeführt, bei denen jeweils die Konzentration von einem Spurenelement variiert wurde. Die Konzentration der beiden anderen Spurenelemente entsprach dabei der nach Ling und Ng (1989) beschriebenen Konzentration. In Abbildung 4.15 ist die Abhängigkeit der Produktion an Fumarsäure von der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Spurenelements vergleichend dargestellt.

Das Ergebnis der Kultivierungen zeigt, dass die Variation der Konzentration an Spurenelementen keinen Einfluss auf die Produktion von Fumarsäure hatte. So wiesen alle Kultivierungen neben einer einheitlichen Mycel-Morphologie vergleichbare Endkonzentrationen an Fumarsäure (56,8 - 63,3 g/L), Ausbeuten (0,44 - 0,51 g/g) und Produktivitäten (0,34 - 0,38 g/(L·h)) auf. Die festgestellten Unterschiede lagen bei allen Kultivierungen innerhalb der entsprechenden Standardabweichungen. Somit zeigte das Kultivierungssystem auch bei sehr geringen Konzentrationen des entsprechenden Spurenelements keine Abnahme der Produktion von Fumarsäure auf.

Um dieses unerwartete Ergebnis zu erklären, wurde die Möglichkeit eines zusätzlichen Eintrags an Spurenelementen in das Kultivierungssystem vermutet. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde das eingesetzte Calciumcarbonat (Typ 2 von VWR), das während der Kultivierung der Regulierung des pH-Werts dient und laut Herstellerangabe eine Reinheit von > 99 % aufweist, genauer untersucht. Hierzu wurde der Calciumcarbonat-Feststoff mittels ICP-OES analysiert und das Ergebnis in Tabelle 4.1 dargestellt. Zusätzlich enthält diese Tabelle die theoretische Konzentration des entsprechenden Spurenelements in Medium C ohne die Zugabe von Calciumcarbonat sowie bei einer Zugabe von 50 g/L.

Ergebnisse und Diskussion

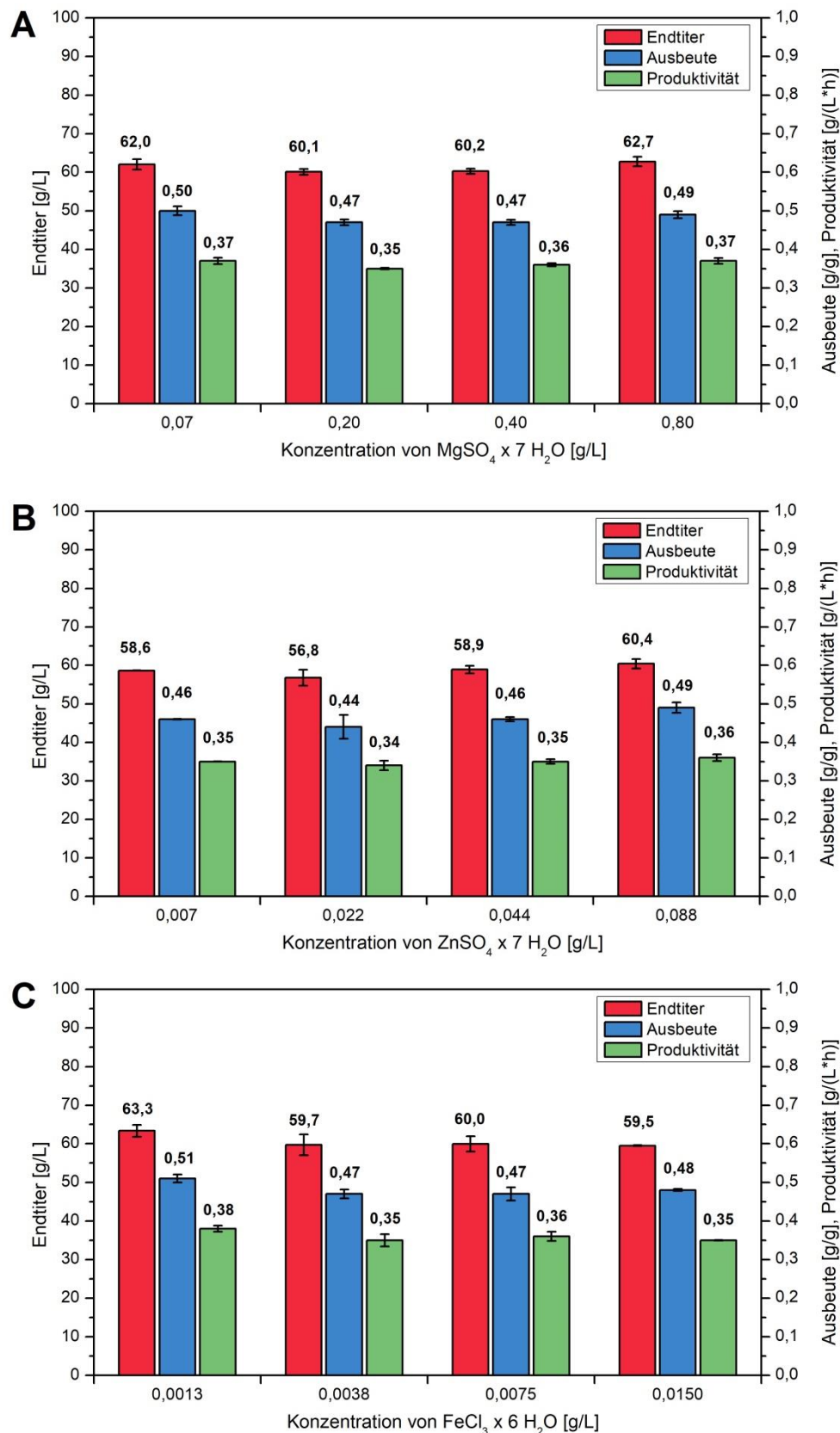


Abbildung 4.15: Einfluss der Konzentration von Spurenelementen auf die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR) nach 7 d; A - Variation der Konzentration von $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, B - Variation der Konzentration von $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, C - Variation der Konzentration von $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$.

Tabelle 4.1: Anteil der Spurenelemente in CaCO₃ (Typ 2 von VWR) und die theoretische Konzentration der Spurenelemente in Medium C, ohne und mit Zugabe von 50 g/L CaCO₃.

Spurenelement	Anteil in CaCO ₃ (Typ 2 von VWR)	Theoretische Konzentration in Medium C	
	[mg/g]	(ohne CaCO ₃) [mg/L]	(mit 50 g/L CaCO ₃) [mg/L]
Magnesium	1,5150 ± 0,0800	39,44	115,19
Zink	0,0014 ± 0,0003	10,00	10,07
Eisen	0,1682 ± 0,0033	1,55	9,96

In Bezug auf die Spurenelemente Magnesium und Eisen konnten signifikante Anteile im Calciumcarbonat-Feststoff nachgewiesen werden. Dies resultiert, bei einer Zugabe von 50 g/L Calciumcarbonat, in einer Erhöhung der Konzentration an elementarem Magnesium in Medium C um ca. 290 % (w/w). Bei elementarem Eisen ergab die Analyse sogar eine Steigerung der Konzentration im Medium von ca. 640 % (w/w). Aufgrund der hier nachgewiesenen Verunreinigungen des eingesetzten Calciumcarbonats können somit die gleichbleibenden Kultivierungsergebnisse bei Variation der eingesetzten Konzentrationen von Magnesium und Eisen erklärt werden. Außerdem wurde durch den hier aufgezeigten zusätzlichen Eintrag an Magnesium und Eisen auf eine Anpassung der Konzentrationen in Medium C verzichtet. Aus diesem Grund wurden für folgende Kultivierungen weiterhin die nach Ling und Ng (1989) beschriebenen Konzentrationen verwendet.

Bezogen auf das Spurenelement Zink konnte nur ein sehr geringer Anteil im Calciumcarbonat-Feststoff nachgewiesen werden. So erhöht sich unter Zugabe von 50 g/L Calciumcarbonat die Konzentration von elementarem Zink in Medium C nur um ca. 1 % (w/w). Um trotz dieser Feststellung die gleichbleibenden Kultivierungsergebnisse bei Variation der initialen Konzentration an Zink zu erklären, kann die prinzipiell sehr hohe Konzentration von 10,0 mg/L Zink im Medium nach Ling und Ng (1989) angeführt werden. Als möglichen Grund hierfür können zwei Publikationen angeführt werden, die Zink eine entscheidende Rolle bei Kultivierungen mit *Rhizopus* sp. zuordnen. So beschrieb bereits Waksman (1943), dass die Zugabe von Zink maßgeblich die Morphologie und damit auch die Produktionseigenschaften von Fumarsäure beeinflusst. Ergänzend hierzu konnte Zhou et al. (2000) aufzeigen, dass nur durch Einsatz von ausreichend Zink eine Morphologie von kleinen Pellets erzielt wurde, die ideal für die Produktion von Fumarsäure war. Da innerhalb der hier durchgeführten Kultivierungen keine Veränderung der Morphologie festgestellt werden konnte, wurde für eine weitere Optimierung des Kultivierungssystems an der bisherigen Konzentration von Zink festgehalten.

4.1.2.7 Einfluss von Phosphat und Ammonium

Bei Kultivierungssystemen, die sich in Vor- und Hauptkultur unterteilen, dient die Vorkultur zunächst dem Auskeimen von Sporen und der Anzucht von Biomasse. In der darauf folgenden Hauptkultur erfolgt anschließend die Produktion von Fumarsäure unter wachstumslimitierenden Bedingungen (Das et al., 2016a). Hierzu werden im Hauptkulturmedium die Konzentration an Phosphat und Ammonium im Vergleich zum Vorkulturmedium deutlich gesenkt. Bei den Medien nach Ling und Ng (1989) findet in Bezug auf Phosphat eine Reduktion der Konzentration an KH_2PO_4 von 1,6 g/L auf 0,3 g/L statt. Bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wird die Konzentration von 4,0 g/L in der Vorkultur auf 1,8 g/L im Hauptkultur-medium reduziert.

Da zu diesem Zeitpunkt der Prozessoptimierung keine Vorkultur mehr eingesetzt wurde, fand sowohl die Anzucht der Biomasse als auch die Produktion von Fumarsäure in der Hauptkultur statt. Um für diese Prozessstrategie die ideale Konzentration an Phosphat und Ammonium festzulegen, wurde zunächst bei einer Konzentration von 1,8 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die Konzentration an KH_2PO_4 variiert und das Ergebnis der Kultivierungen in Abbildung 4.16 graphisch dargestellt. Bei allen Kultivierungen konnte die Ausbildung von loser Mycel-Morphologie beobachtet werden.

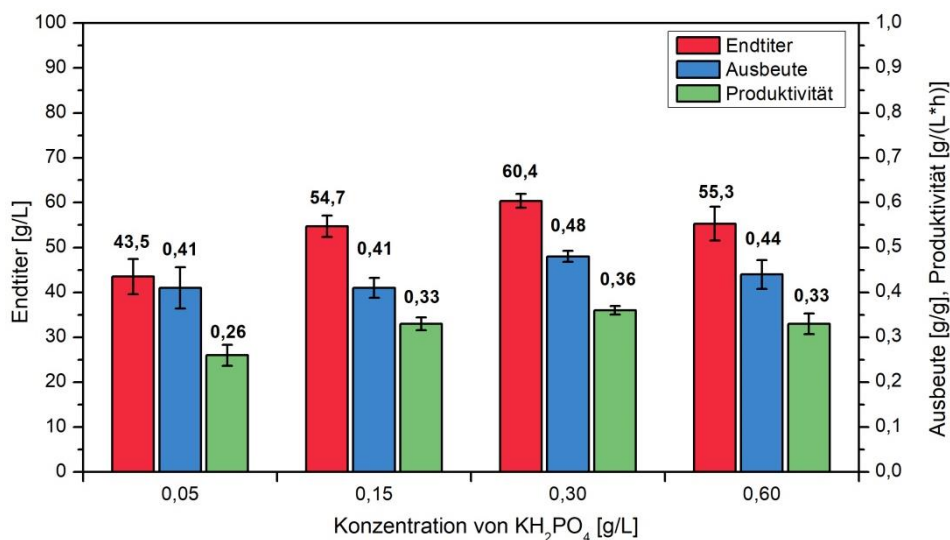


Abbildung 4.16: Einfluss der Konzentration von KH_2PO_4 auf die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR) nach 7 d.

Dabei wurde im Bereich von 0,05 g/L bis 0,30 g/L KH_2PO_4 eine Zunahme des nach 7 d erreichten Endtiters an Fumarsäure (43,5 g/L - 60,4 g/L) detektiert. Als Ursache für die zunehmende Gesamtproduktivität konnte während der Kultivierung qualitativ die Bildung von mehr Biomasse, bei steigenden Konzentrationen an Phosphat festgestellt werden. Somit stellen Konzentrationen unterhalb von 0,30 g/L KH_2PO_4 wachstumslimitierende Bedingungen dar, die sich negativ auf die Produktion von Fumarsäure auswirken. Unter Verdopplung der Phosphatkonzentration auf 0,60 g/L KH_2PO_4 wurde während der Kultivierung dagegen qualitativ deutlich mehr Biomasse ausgebildet. Diese lag zwar noch in Form von losem Mycel vor, zeigte allerdings eine Abnahme der Produktions-eigenschaften nach 7 d auf.

Anhand dieses Ergebnisses kann somit eine Konkurrenzsituation zwischen dem Aufbau von Biomasse und der Produktion von Fumarsäure abgeleitet werden, die beide vom Verbrauch der Kohlenstoff- und Energiequelle Glucose abhängig sind. So ermöglichte eine Erhöhung der Konzentration an Phosphat die Bildung von mehr Biomasse unter Mycel-Morphologie. Allerdings konnte mit zunehmender Menge an Biomasse und dem damit verbundenen erhöhten Verbrauch von Glucose, keine kontinuierliche Steigerung der Produktion von Fumarsäure beobachtet werden. Vielmehr wurde mit 0,30 g/L KH_2PO_4 ein Optimum identifiziert, das unter der Bildung von ausreichend Biomasse die besten Produktionseigenschaften aufwies. Daher wurde für weitere Kultivierungen an der bisherigen Konzentration von 0,30 g/L KH_2PO_4 im Medium festgehalten.

Zur Untersuchung des Einflusses von Ammonium wurde die Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Bereich von 0,30 g/L bis 3,60 g/L untersucht und das Kultivierungsergebnis nach 7 d in Abbildung 4.17 dargestellt.

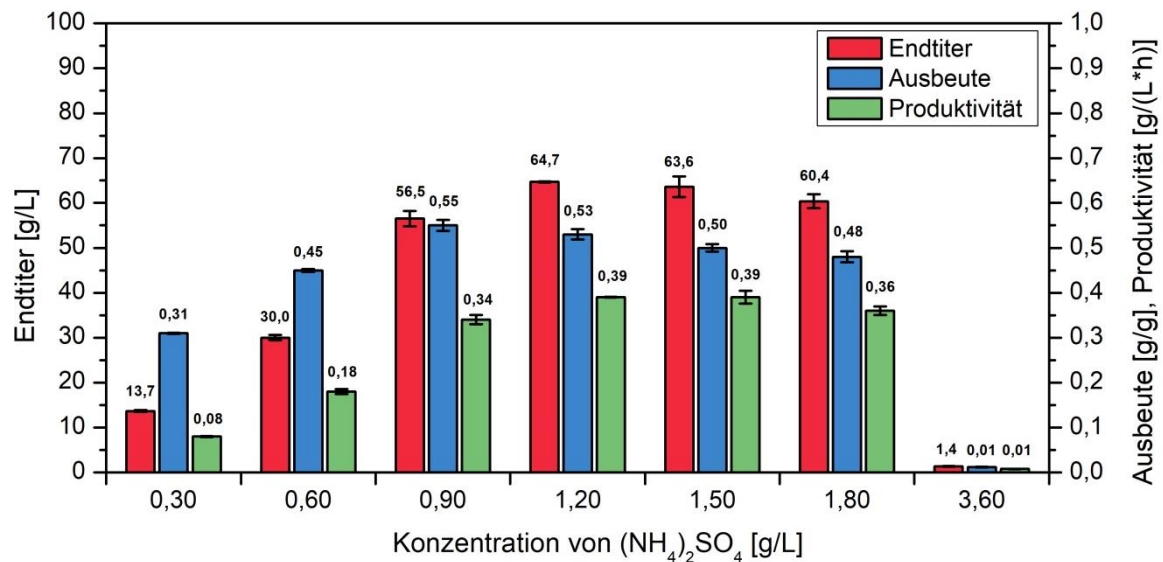


Abbildung 4.17: Einfluss der Konzentration von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR) nach 7 d.

Analog zu Kultivierungen mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen wurde auch bei zunehmender Konzentration an Ammonium qualitativ die Bildung von mehr Biomasse beobachtet. Dabei konnte im Bereich von 0,30 g/L bis 1,80 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ das Auftreten von Mycel-Morphologie nachgewiesen werden. Unter Verwendung von 3,60 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bildete der Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 dagegen Klumpen aus, die mit 1,4 g/L nur eine sehr geringe Produktion von Fumarsäure ermöglichten. In Bezug auf die ideale Konzentration an Ammonium wurde mit 1,20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ein Optimum identifiziert. Dieses ermöglichte innerhalb von 7 d die Akkumulation von 64,7 g/L Fumarsäure, bei einer Ausbeute von 0,53 g/g und einer Produktivität von 0,39 g/(L·h). Anzumerken ist hierbei, dass eine Reduktion der initialen Konzentration an Ammonium unter 1,20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ keinen vollständigen Umsatz der eingesetzten Menge an Glucose innerhalb von 7 d ermöglichte. So wies die Kultivierung mit 0,90 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zwar die höchste Ausbeute (0,55 g/g) innerhalb dieser Versuchsreihe auf, durch die geringere Menge an Biomasse konnte allerdings nur eine Produktivität von 0,34 g/(L·h) festgestellt werden. Bei einer Erhöhung der Konzentration an Ammonium auf 1,50 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konnte dagegen, im Vergleich zu 1,20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, eine gleichbleibende Produktivität von 0,39 g/(L·h) detektiert

werden. Allerdings wurde durch den Aufbau von zusätzlicher Biomasse und dem damit verknüpften erhöhten Glucoseverbrauch, eine Abnahme der Ausbeute auf 0,50 g/g festgestellt. Somit ermöglichte eine initiale Konzentration von 1,20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die Bildung von ausreichend Biomasse, die in dem hier untersuchten Kultivierungssystem die besten Produktionseigenschaften aufwies. Für folgende Kultivierungen wurde daher die Konzentration an Ammonium von 1,80 g/L auf 1,20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gesenkt.

4.1.2.8 Einfluss der Partikelgröße von Calciumcarbonat

Durch einen Herstellerwechsel bezüglich des eingesetzten Calciumcarbonats konnte in Kapitel 4.1.2.2 eine Verbesserung der Morphologie und der Produktionseigenschaften von Fumarsäure erzielt werden. In diesem Zusammenhang konnten mikroskopische Unterschiede bei der Partikelgröße festgestellt werden. Um den Einfluss dieser Beobachtung genauer zu untersuchen, wurde das Calciumcarbonat von Roth (Typ 1), das qualitativ eine höhere Partikelgröße aufwies und bisher die Bildung von Klumpen verursachte, mechanisch zerkleinert. Hierzu wurde das Calciumcarbonat in einer Kugelmühle bei 250 rpm für 10 h gemahlen und die erzielte Veränderung der Partikelgröße mikroskopisch untersucht.

Um zusätzlich auch quantitative Aussagen über die Partikelgröße treffen zu können, wurden die verschiedenen Typen an Calciumcarbonat mittels fokussierter Laserrückstreuung (FBRM, englisch - focused beam reflectance measurement) analysiert. Die Bestimmung der durchschnittlichen Partikelgröße (D_p) erfolgte an der Universität Complutense Madrid (s. Anhang A.3). Abbildung 4.18 zeigt das Ergebnis der mechanischen Zerkleinerung von Calciumcarbonat (Typ 1 von Roth) im Vergleich zu nicht zerkleinertem Calciumcarbonat (Typ 2 von VWR), unter Angabe der mittels FBRM analysierten Partikelgröße.

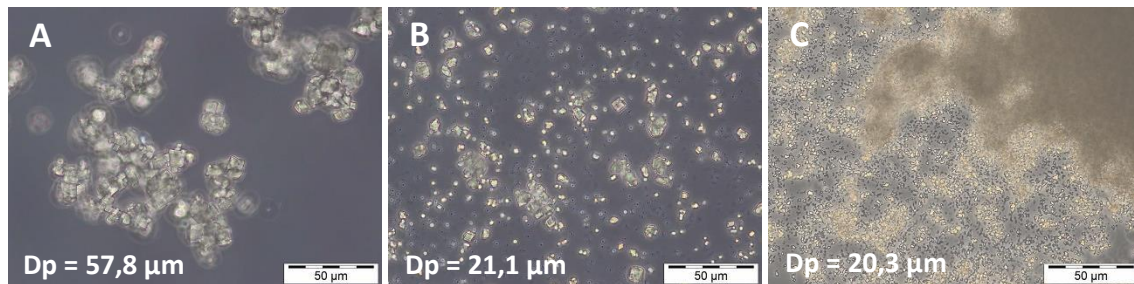


Abbildung 4.18: Mikroskopische Aufnahmen von Calciumcarbonat; A - CaCO_3 von Roth (Typ 1), B - mechanisch zerkleinertes CaCO_3 von Roth (Typ 1), C - CaCO_3 von VWR (Typ 2); Quantitative Bestimmung der Partikelgröße mittels FBRM.

Durch die mechanische Zerkleinerung des Calciumcarbonats (Typ 1 von Roth) konnte eine Reduktion der ursprünglichen Partikelgröße von 57,8 µm auf 21,1 µm nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4.18, A und B). Somit entspricht die erzielte Größe der Partikel eher der des Calciumcarbonats von VWR (Typ 2), das eine durchschnittliche Partikelgröße von 20,3 µm aufwies. Um darauf aufbauend den Einfluss einer reduzierten Partikelgröße auf die Produktion von Fumarsäure zu untersuchen, wurden Kultivierungen mit nicht zerkleinertem Calciumcarbonat und zerkleinertem Calciumcarbonat (Typ 1 von Roth) durchgeführt. Dabei wurden dem Kultivierungsansatz 50 g/L des entsprechenden Calciumcarbonats zugegeben und die bisher vorgenommenen Prozessoptimierungen verwendet. Die dabei erzielten Kultivierungsverläufe sind vergleichend in Abbildung 4.19 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

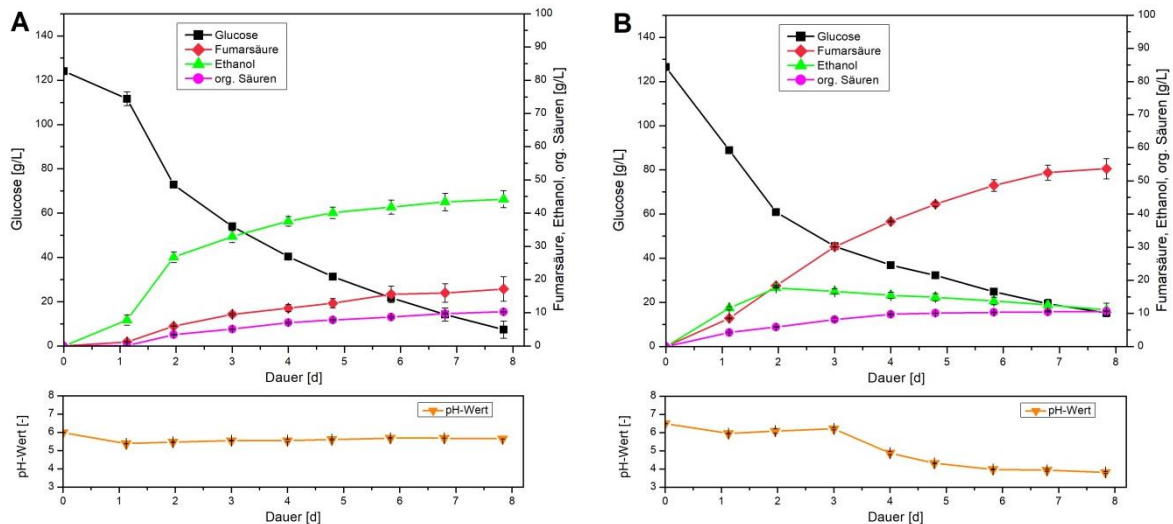


Abbildung 4.19: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C und 200 rpm; A - Kultivierung mit 50 g/L CaCO₃ (Typ 1 von Roth), B - Kultivierung mit 50 g/L mechanisch zerkleinertem CaCO₃ (Typ 1 von Roth).

Unter Einsatz des nicht zerkleinerten Calciumcarbonats von Roth (Typ 1) konnte auch unter den optimierten Medienbedingungen das Ausbilden von Biomasseklumpen nicht verhindert werden. Dabei wurde unter nicht vollständigem Verbrauch von Glucose hauptsächlich Ethanol (44,2 g/L) gebildet und mit 17,5 g/L nach 8 d nur eine geringe Konzentration an Fumarsäure erreicht. Dies entspricht einer Ausbeute von lediglich 0,15 g/g und einer Produktivität von 0,09 g/(L·h). Bei der Kultivierung mit zerkleinerten Partikeln an Calciumcarbonat desselben Typs konnte dagegen ein Zusammenklumpen der Biomasse erfolgreich verhindert werden. So wies die Biomasse von *R. arrhizus* NRRL 1526 Mycel-Morphologie auf, die allerdings nicht in Form von einzelnen Mycelflocken vorlag. Vielmehr bildete sich ein zusammenhängendes Geflecht aus losem Mycelium aus. Somit kann die hier erzielte Morphologie als Zwischenstufe zwischen kompakten Klumpen und einzelnen Mycelflocken beschrieben werden. Bezogen auf die Produktion von Fumarsäure konnte bereits nach einer Kultivierungsdauer von 1 d eine einsetzende Akkumulation von Fumarsäure festgestellt werden. Begleitet wurde dies von einer hohen Abnahme der Glucosekonzentration und einer erhöhten Bildung an Ethanol, die mit 17,7 g/L nach 2 d ein Maximum erreichte. Mit 53,7 g/L Fumarsäure erreichte das Kultivierungssystem nach 8 d einen maximalen Endtiter, bei einer Ausbeute von 0,48 g/g und einer Produktivität von 0,29 g/(L·h). Dabei konnte, bezogen auf die vorgelegte Konzentration an Glucose, keine vollständige Verstoffwechslung innerhalb des hier untersuchten Kultivierungszeitraums festgestellt werden.

Ein Vergleich der beiden hier dargestellten Kultivierungen veranschaulicht deutlich den großen Einfluss der Partikelgröße des Calciumcarbonats auf die Morphologie und die Produktion von Fumarsäure. Ergänzend zu dieser Feststellung konnte Das et al. (2016b) ebenfalls eine Steigerung der Fumarsäureproduktion beim Einsatz von Calciumcarbonat mit einer geringeren Partikelgröße feststellen. Unter gleichbleibender Morphologie wird in dieser Publikation eine reduzierte Viskosität des Kultivierungsansatzes als mögliche Ursache für eine verbesserte Produktivität an Fumarsäure genannt. Zusätzlich beschreibt Das et al. (2016b), dass kleinere Calciumcarbonatpartikel eine höhere spezifische Oberfläche aufweisen, die eine schnellere Neutralisation der produzierten Fumarsäure ermöglicht.

Zusammenfassend kann bei den hier erzielten Kultivierungsergebnissen festgestellt werden, dass durch eine Zerkleinerung des Calciumcarbonats (Typ 1 von Roth) eine Steigerung der Fumarsäure-produktion prinzipiell möglich ist. Allerdings zeigt eine Einordnung dieses Ergebnisses in bisher durchgeführte Kultivierungen, dass bessere Produktionseigenschaften unter Verwendung von Calciumcarbonat (Typ 2 von VWR) erzielt wurden (vgl. Kapitel 4.1.2.7). Daher wurde bei zukünftigen Kultivierungen weiterhin das Calciumcarbonat von VWR (Typ 2) verwendet.

4.1.2.9 Einfluss durch Zugabe von Calciumcarbonat

Zur Regulierung des pH-Wertes wurde in bisherigen Kultivierungen dem System 50 g/L Calciumcarbonat hinzugegeben. Durch die vorgenommenen Optimierungen und der daraus resultierenden Steigerung der Produktion an Fumarsäure kommt es zu einem vollständigen Verbrauch des Calciumcarbonats während der Kultivierung. Erkennbar ist dies bei fortschreitender Fumarsäure-produktion durch das Absinken des pH-Wertes (s. Abbildung 4.20, A). Ergänzend zu dieser Beobachtung beschreibt Roa Engel et al. (2011), dass ein zu frühes Absinken des pH-Wertes negative Auswirkungen auf die Produktion von Fumarsäure hat. Weiter wird beschrieben, dass am Ende der Kultivierung eine Regulierung des pH-Wertes nicht mehr erforderlich ist und somit kein Unterschied bezüglich der Produktionseigenschaften an Fumarsäure festzustellen ist.

Zur Untersuchung dieser Aussage und um ein zu frühes Absinken des pH-Wertes zu verhindern, wurde eine Kultivierung durchgeführt bei der nach 3, 4 und 5 d jeweils 10 g/L Calciumcarbonat hinzugegeben wurden. Insgesamt wurden somit 80 g/L Calciumcarbonat zur Stabilisierung des pH-Wertes während der Kultivierung eingesetzt. Der entsprechende Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.20, B dargestellt.

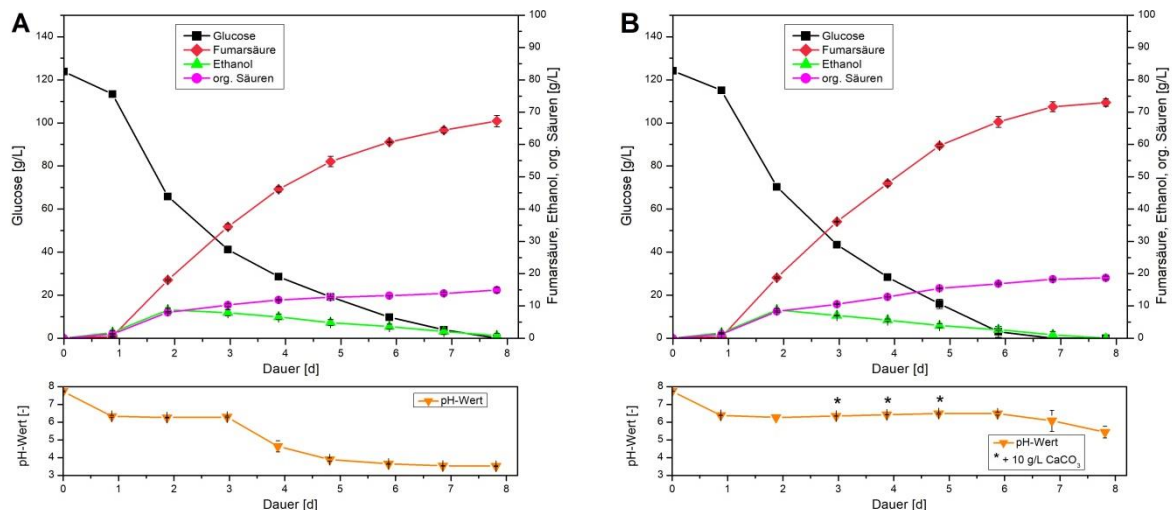


Abbildung 4.20: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); A - Kultivierung ohne weitere Zugabe von CaCO₃, B - Kultivierung mit Zugabe von 10 g/L CaCO₃ nach 3, 4 und 5 d.

Ein Vergleich der beiden Kultivierungen zeigt deutliche Unterschiede in Bezug auf den Verlauf des pH-Wertes auf. So wurde unter Einsatz von 50 g/L Calciumcarbonat zunächst ein stabiler pH-Wert von ca. 6,3 im Zeitraum von 1 - 3 d detektiert. Nach dem vollständigen Verbrauch des Calcium-carbonats sank der pH-Wert anschließend ab und erreichte bei fortschreitender Produktion von Fumarsäure einen Wert

von ca. 3,5 am Ende der Kultivierung. Bei der Kultivierung mit dreimaliger Zugabe von jeweils 10 g/L Calciumcarbonat konnte dagegen das frühzeitige Absinken des pH-Wertes erfolgreich verhindert werden. So wurde der Kultivierungsbereich, der einen konstanten pH-Wert von ca. 6,4 aufwies, bis zu einer Kultivierungsdauer von 6 d aufrechterhalten. Erst ab diesem Zeitpunkt kam es zu einem Aufbrauchen der insgesamt eingesetzten Menge von 80 g/L Calciumcarbonat. Im weiteren Verlauf fiel der pH-Wert auf einen Endwert von 5,5 nach 8 d. Neben dem Verlauf des pH-Wertes konnten auch in Bezug auf die Produktion von Fumarsäure Unterschiede festgestellt werden. So wies die Kultivierung mit 50 g/L Calciumcarbonat ohne die zusätzliche Zugabe von Calciumcarbonat ab einer Kultivierungsdauer von 3 d eine abnehmende Produktion von Fumarsäure auf. Der Rückgang der Produktivität ging dabei einher mit dem Abfallen des pH-Wertes. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 d konnte eine maximale Konzentration an Fumarsäure von 67,2 g/L detektiert werden. Bei der Kultivierung mit dreimaliger Zugabe von Calciumcarbonat fiel dagegen die Abnahme der Produktivität geringer aus. Dies resultierte unter vollständigem Glucoseverbrauch in einer gesteigerten Endkonzentration von 73,0 g/L Fumarsäure nach 8 d.

Somit kann anhand dieser Versuche belegt werden, dass ein zu frühes Absinken des pH-Wertes negative Auswirkungen auf die Produktion von Fumarsäure hat. Für folgende Kultivierungen wurde daher der Ansatz einer verlängerten Regulierung des pH-Wertes durch die Zugabe von zusätzlichem Calciumcarbonat angewendet. Ergänzend hierzu wurden in Kapitel 4.1.4.5 weitere Untersuchungen beschrieben, um den idealen Zeitpunkt festzulegen, ab dem eine Regulierung des pH-Wertes nicht mehr notwendig ist.

4.1.3 Referenzkultivierung mit direkter Sporeninokulation

In Kapitel 4.1.2 wurde, basierend auf dem Patent von Ling und Ng (1989), eine Optimierung des Kultivierungssystems durchgeführt. Dabei wurden folgende Veränderungen an der Prozessstrategie und am Medium vorgenommen:

- Direktes Animpfen der Hauptkultur mit Sporen (ohne Vorkultur)
- Einsatz eines Minimalmediums ohne Komplexmedienbestandteile
- Weglassen von Weinsäure im Medium
- Reduktion der Konzentration von Ammonium auf 1,20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Wechsel des Herstellers von Calciumcarbonat
- Zusätzliche Zugabe von Calciumcarbonat während der Kultivierung

Unter Anwendung dieser Anpassungen konnte eine deutliche Verbesserung des Produktionssystems erzielt werden. Dabei ermöglichte die direkte Inokulation des Hauptkulturmediums mit Sporensuspension eine klare Vereinfachung des Kultivierungssystems und ließ somit eine effektive Medienoptimierung zu. Zusätzlich handelt es sich bei der Kultivierungsstrategie mit direkter Sporeninokulation um eine neue Art der Fumarsäureproduktion, die bisher noch nicht in Veröffentlichungen beschrieben worden ist. In diesem Kapitel werden daher zunächst die Produktionseigenschaften dieses Kultivierungssystems genauer charakterisiert. Hierzu wurde eine Kultivierung in Schüttelkolben mit direkter Sporeninokulation und dem optimierten Medium C durchgeführt. Der erzielte Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.21 dargestellt.

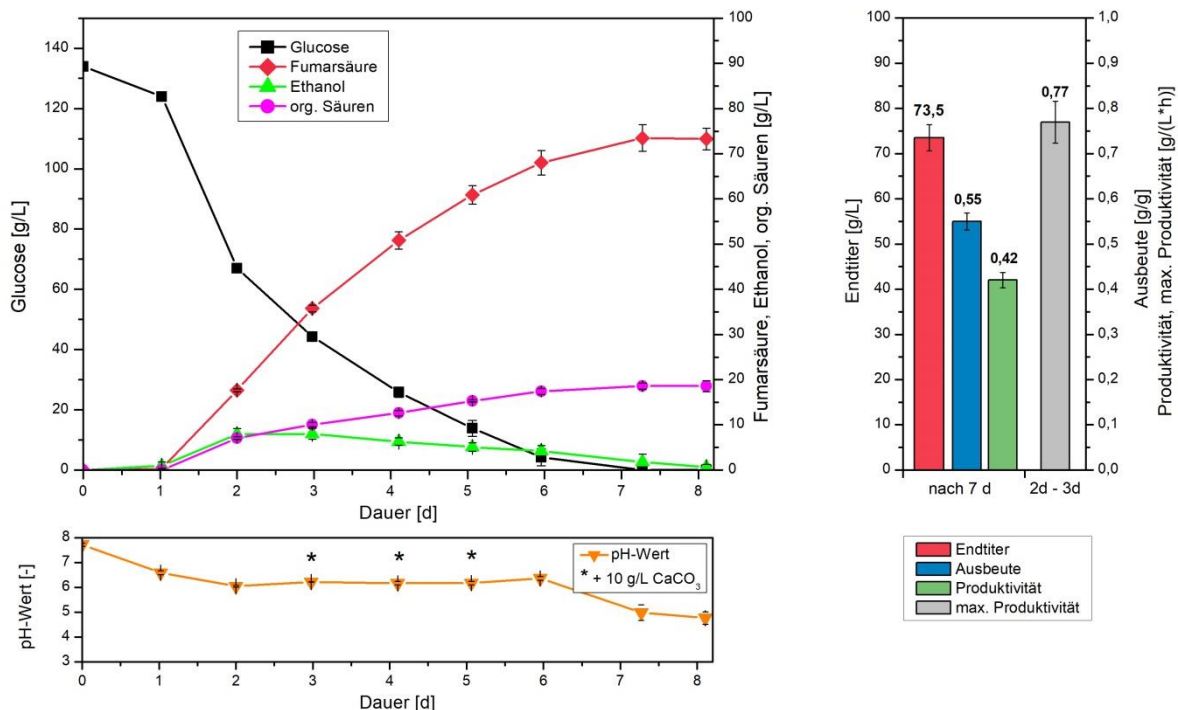


Abbildung 4.21: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 10 g/L CaCO_3 nach 3, 4 und 5 d.

Unter geringem Glucoseverbrauch konnte innerhalb der ersten 24 h zunächst weder die Produktion von Fumarsäure noch die Bildung von Nebenprodukten detektiert werden. Diese Phase der Kultivierung kann daher als lag-Phase bezeichnet werden. Innerhalb des zweiten Tages wurde dagegen eine deutlich gesteigerte Abnahme der Glucosekonzentration und das Einsetzen der Fumarsäureproduktion beobachtet. Neben Fumarsäure setzte in diesem Zeitraum auch die Akkumulation von anderen organischen Säuren und Ethanol ein. Die Konzentration an Ethanol erreicht dabei nach einer Kultivierungsdauer von 2 d ein Maximum von 8,0 g/L. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wies das Kultivierungssystem eine Abnahme des Glucoseverbrauchs auf. Bezogen auf die Produktion von Fumarsäure konnte innerhalb des zweiten und dritten Tages eine maximale Produktivität von 0,77 g/(L·h) festgestellt werden, die allerdings im weiteren Verlauf rückläufig war. So konnte nach 7 d und der vollständigen Verstoffwechslung von Glucose eine Gesamtproduktivität von 0,42 g/(L·h) detektiert werden. Bei einem Endtiter von 73,5 g/L Fumarsäure entspricht dies einer Ausbeute von 0,55 g/g. Neben Fumarsäure konnte mit 18,6 g/L auch für die Bildung von anderen organischen Säuren nach 7 d ein Maximum festgestellt werden. In Bezug auf Ethanol wurde nach dem Erreichen eines Maximums nach 2 d eine abnehmende Konzentration dokumentiert, die nach 7 d einen Wert von 1,8 g/L erreichte.

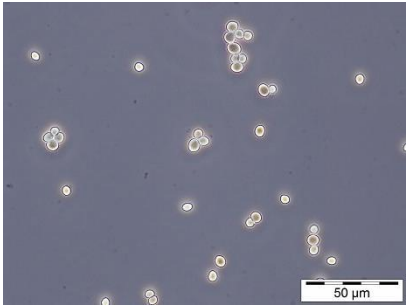
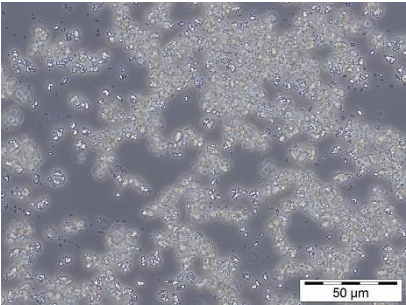
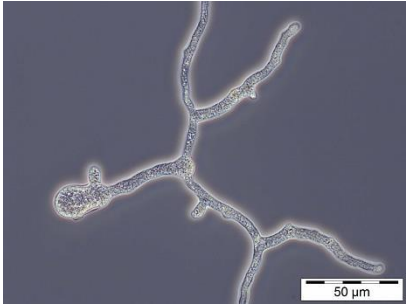
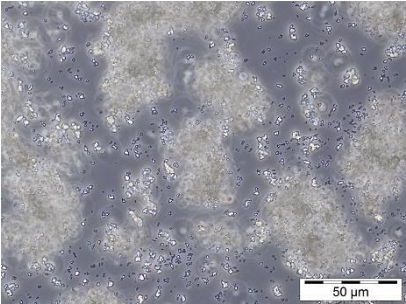
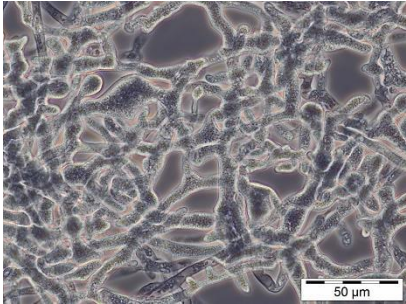
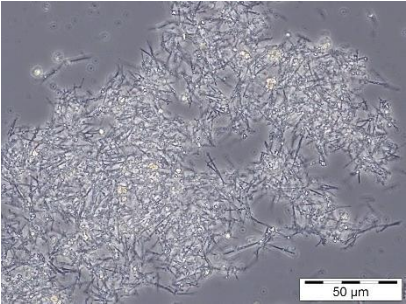
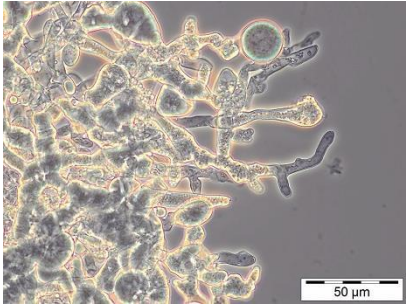
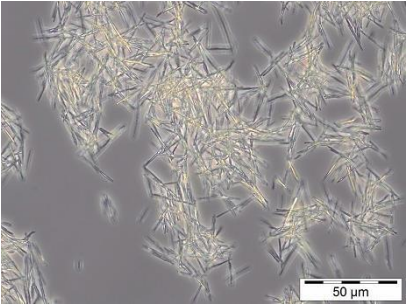
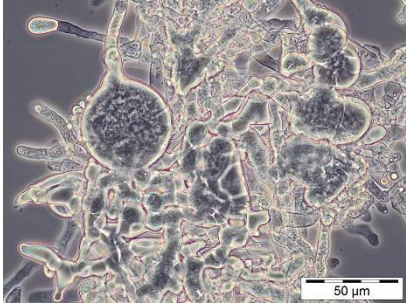
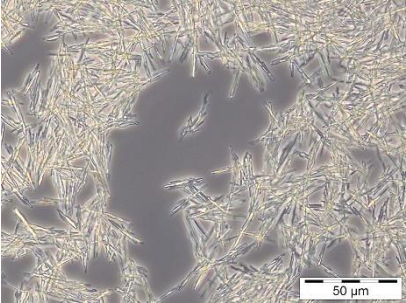
Um den Verlauf der hier aufgezeigten Kultivierung genauer zu verstehen und bestimmte Veränderungen während der Kultivierung erklären zu können, kommt der Wachstumsform des verwendeten Pilzes eine Schlüsselfunktion zu. Daher wird im folgend Kapitel ausführlich die Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei Kultivierungen mit direkter Sporeninokulation beschrieben.

4.1.3.1 Charakterisierung der Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526

Um das Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei einer Schüttelkolbenkultivierung mit direkter Sporeninokulation qualitativ beschreiben zu können, wurden während der Kultivierung Proben entnommen, mikroskopisch untersucht und in Tabelle 4.2 dargestellt. Neben der aufgetretenen Morphologie enthält diese Tabelle mikroskopische Aufnahmen von Calciumcarbonat und den ausgefallenen Salze der Fumarsäure, die zum jeweiligen Zeitpunkt der Kultivierung im Medium vorlagen. Zur weiteren Veranschaulichung ist in Abbildung 4.22 zusätzlich die erzielte Morphologie nach einer Kultivierungsdauer von 3 d mikroskopisch und makroskopisch dargestellt.

Durch das direkte Animpfen mit Sporensuspension lagen zu Beginn der Kultivierung ausschließlich kleine, runde Sporen im Medium vor. Dabei stellt jede einzelne Spore eine potenzielle Keimzelle für die Ausbildung von Biomasse dar. So konnte innerhalb der ersten 24 h, unter geringem Glucoseverbrauch, das Auskeimen der Sporen dokumentiert werden. Hierbei bildeten sich zunächst einzelnen Hyphen aus, die nur eine geringe Anzahl an Verzweigungen aufwiesen. Da innerhalb dieses Zeitraums noch keine Fumarsäureproduktion detektiert wurde, kann das Auftreten einer lag-Phase mit der hier dokumentierten Sporenkeimung erklärt werden.

Tabelle 4.2: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation; Mikroskopische Aufnahmen der Hauptkultur mit optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 10 g/L CaCO₃ nach 3, 4 und 5 d.

Dauer	Morphologie von <i>R. arrhizus</i>	CaCO ₃ /Salze der FA
0 d		
1 d		
3 d		
5 d		
7 d		

Im weiteren Kultivierungsverlauf bildeten sich, ausgehend von dieser Struktur, einzelne Mycelflocken aus, die einen hohen Grad an verflochtenen Hyphen aufwiesen. Somit kann neben der einsetzenden Produktion von Fumarsäure und Nebenprodukten auch die hier qualitativ nachgewiesene Biomassezunahme als mögliche Ursache für den erhöhten Glucoseverbrauch angeführt werden. Ergänzend hierzu deutet die Akkumulation von Ethanol zwischen dem ersten und zweiten Tag auf sauerstofflimitierte Bedingungen hin, die durch einen erhöhten Energiebedarf aufgrund des Biomassewachstums verursacht werden können (Fu et al., 2010). Für diese These spricht auch, dass im weiteren Verlauf der Kultivierung eine kontinuierliche Abnahme der Konzentration an Ethanol detektiert wurde und gleichzeitig qualitativ keine weitere Größenzunahme der Mycelflocken auftrat.

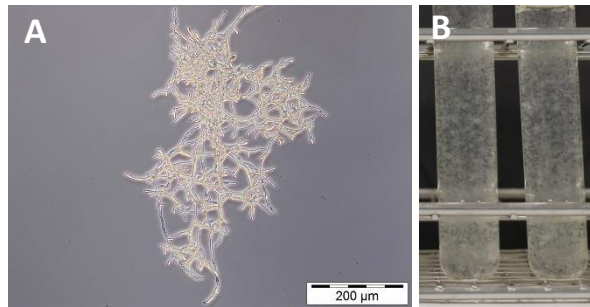


Abbildung 4.22: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C nach 3 d; A - mikroskopische Aufnahme der Mycel-Morphologie, B - makroskopische Aufnahme von Mycelflocken.

In Bezug auf vorliegende Feststoffe konnte im Medium innerhalb der ersten beiden Tage ausschließlich die Präsenz von Calciumcarbonat nachgewiesen werden. Dabei nahm die Anzahl der Calciumcarbonatpartikel zwar qualitativ ab, durch die dreimalige Zugabe von jeweils 10 g/L lag bis zu einer Kultivierungsdauer von 6 d Calciumcarbonat im Kultivierungsansatz vor. Nach diesem Zeitpunkt konnte mikroskopisch kein Calciumcarbonat mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtung geht mit dem Abfallen des pH-Wertes nach einer Kultivierungsdauer von 7 d einher (s. Abbildung 4.21) und bestätigt somit das vollständige Aufbrauchen von Calciumcarbonat. Neben Calciumcarbonat und Biomasse konnte nach 3 d ein weiterer Feststoff im Kultivierungsansatz detektiert werden. Dabei handelte es sich um Fumarsäure bzw. Calciumfumarat, die aufgrund der geringen Löslichkeit in Form von nadelförmigen Kristallen ausfiel. Vergleicht man dabei die Größe der Kristalle über den Kultivierungszeitraum von 3 d - 7 d, kann eine Größenzunahme mit fortschreitender Kultivierungsdauer bzw. steigender Konzentration an Fumarsäure festgestellt werden.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass mit fortschreitender Kultivierungsdauer und der Bildung von Kristallen eine Veränderung der Morphologie auftrat. Zwar wuchs *R. arrhizus* NRRL 1526 weiterhin in Form von Mycelflocken, allerdings bildeten sich innerhalb und an den Spitzen der Hyphen Verdickungen aus. Diese Verdickungen waren teilweise unregelmäßig geformt oder stellten runde Kapseln dar, die unterschiedliche Durchmesser aufwiesen.

Als mögliche Ursache für das Ausbilden von Verdickungen innerhalb der Hyphen wurde eine Schädigung der Zellen vermutet. Diese könnte beispielsweise durch einen erhöhten Scherstress während der Kultivierung verursacht werden. So befindet sich die vorliegende Biomasse in einem Kultivierungssystem in dem zum einen Calciumcarbonatpartikel und nach einer Kultivierungsdauer von 3 d auch nadelförmige Fumarsäurekristalle vorliegen. In Kombination mit der eingesetzten

Schüttelgeschwindigkeit von 200 rpm ist dadurch prinzipiell eine Schädigung der vorliegenden Biomasse vorstellbar. Ergänzend hierzu wurde in zwei Publikationen bereits beschrieben, dass ein abnormales Anschwellen der Hyphen bei *Rhizopus* sp. auf eine zelluläre Schädigung hindeutet. Weitergehend konnte dabei eine unregelmäßige Zunahme der Zellwanddicke, bei gleichzeitig erhöhter Permeabilität der Zelle aufgezeigt werden (El Ghaouth et al., 1992; Alfaro-Gutierrez et al., 2014). Um diese Feststellung bei der hier vorliegenden Morphologie zu untersuchen, wurden Mycelflocken nach einer Kultivierungsdauer von 7 d mit Propidiumiodid eingefärbt. Bei Propidiumiodid handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der als Nukleinsäurenindikator verwendet wird. Da hierfür eine Bindung des Farbstoffs an intrazellulär vorliegende DNA bzw. RNA notwendig ist, werden bei diesem Verfahren ausschließlich Zellbereiche eingefärbt, die eine perforierte, nicht intakte Zellhülle besitzen (Yeh et al., 1981).

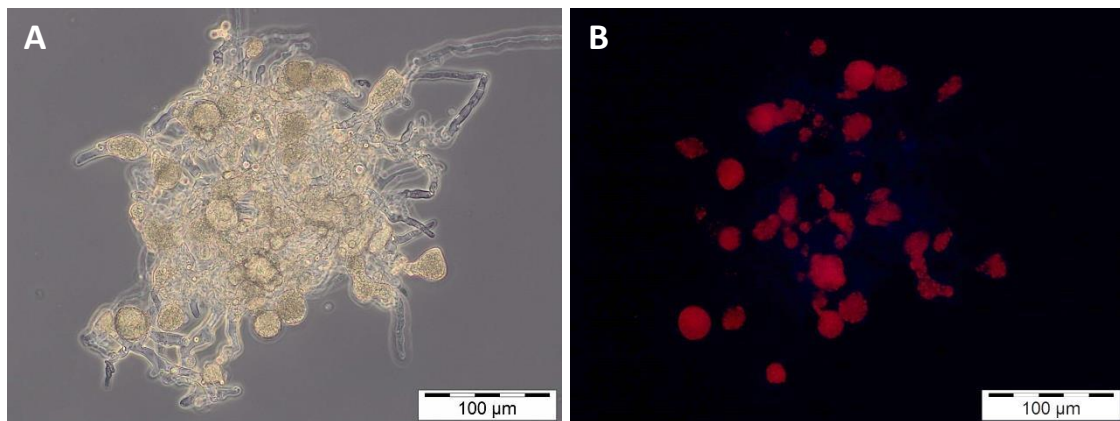


Abbildung 4.23: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C nach 7 d; A - Mycelium ohne Fluoreszenzfärbung, B - Mycelium mit Fluoreszenzfärbung (Propidiumiodid).

Die in Abbildung 4.23 dargestellte Fluoreszenzfärbung einer Mycelflocke zeigt deutlich, dass ausschließlich Bereiche der Biomasse rot eingefärbt sind, die Kapseln oder verdickte Hyphen aufwiesen. Bereiche mit normal ausgebildeten Hyphen wurden dagegen nicht eingefärbt. Anhand dieses Versuches konnte somit die Schädigung von bestimmten Bereichen innerhalb des Myceliums bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei dieser Veränderung um einen normalen Alterungsprozess der Biomasse handelt oder um eine Schädigung, die durch die hier vorliegenden Kultivierungsbedingungen begünstigt wurde. Außerdem wurden keine genaueren Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen auf die Produktionseigenschaften von Fumarsäure durchgeführt.

4.1.3.2 Einfluss der initialen Glucosekonzentration

Bei bisher durchgeführten Kultivierungen wurde nach Ling und Ng (1989) eine Glucosekonzentration von 130 g/L verwendet. Ein Vergleich mit weiteren Publikationen zeigt allerdings, dass der Einsatz von geringeren Konzentrationen wie beispielsweise 80 g/L Glucose durchaus üblich ist (Fu et al., 2009; Xu et al., 2017). Dabei ist anzumerken, dass Glucose nicht nur als Kohlenstoff- und Energiequelle zur Akkumulation von Fumarsäure dient, sondern auch zur Produktion von Biomasse. Zusätzlich konnte in Kapitel 4.1.2.7 der Einfluss von Ammonium, das innerhalb der Kultivierung als Stickstoffquelle zum Aufbau von Biomasse dient, aufgezeigt werden. Hinsichtlich eines optimalen Verhältnisses von

aufgebauter Biomasse und dem Potenzial Fumarsäure zu produzieren, kommt somit dem C/N-Verhältnis bei Kultivierungen eine entscheidende Rolle zu (Ding et al., 2011).

Zur allgemeinen Untersuchung des Einflusses der initialen Glucosekonzentration auf das Produktionssystem wurden daher Kultivierungen mit unterschiedlichen Startkonzentrationen an Glucose (40 - 200 g/L) durchgeführt. Dabei wurden die Kultivierungen unter den in Kapitel 4.1.2 optimierten Bedingungen durchgeführt und durch Zugabe von zusätzlichem Calciumcarbonat bei allen Kultivierungen ein Absinken des pH-Wertes verhindert. Weiterhin enthielt das Medium bei allen Ansätzen eine Konzentration von 1,20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die sich daraus ergebenden unterschiedlichen C/N-Verhältnisse sind in Tabelle 4.3 vergleichend dargestellt. Zusätzliche enthält diese Tabelle eine Übersicht der erzielten Morphologie und der entsprechenden Kultivierungsdauer bis zur vollständigen Verstoffwechslung der eingesetzten Menge an Glucose.

Tabelle 4.3: Variation der initialen Glucosekonzentration bei der Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526; Hauptkultur mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C (1,20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO_3 .

Kultivierungsansatz		1	2	3	4	5	6	7
Initiale Glucose	[g/L]	40	60	80	100	130	160	200
C/N-Verhältnis	[gC/gN]	63	94	126	157	204	252	314
Morphologie	[-]	Klumpen	Mycel	Mycel	Mycel	Mycel	Mycel	Mycel
Kultivierungsdauer	[d]	2	3	4	6	7	11	15

Bezogen auf die erzielte Morphologie konnte in einem Konzentrationsbereich von 60 - 200 g/L initialer Glucose das Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 in Form von losen Mycelflocken beobachtet werden. Bei dem Kultivierungsansatz mit der geringsten Glucosekonzentration von 40 g/L bildeten sich dagegen Klumpen aus, die für die Produktion von Fumarsäure ungeeignet sind. Unter Berücksichtigung des in diesem Ansatz verwendeten C/N-Verhältnisses von 63 gC/gN kann somit ein kritisches Minimum von ca. 60 - 90 gC/gN identifiziert werden, das zur Ausbildung der präferierten Mycel-Morphologie nicht unterschritten werden sollte. Diese Feststellung steht dabei in Übereinstimmung mit den Untersuchungen aus Kapitel 4.1.2.7. In den dort durchgeführten Kultivierungen wurde bei einer Glucosekonzentration von 130 g/L und 1,80 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (C/N-Verhältnis von 136 gC/gN) die Ausbildung von Mycelflocken beobachtet. Dagegen wies der Kultivierungsansatz mit 130 g/L Glucose und 3,60 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (C/N-Verhältnis von 68 gC/gN) kompakte Klumpen auf. Somit konnte anhand dieser Ergebnisse der Einfluss des C/N-Verhältnisses auf die Wachstumsform bestätigt und dadurch eine gezielte Kontrolle der Morphologie bei dem hier verwendeten Kultivierungssystem ermöglicht werden.

Um nun den Einfluss der initialen Glucosekonzentration auf die Produktion von Fumarsäure zu untersuchen, wurde nach vollständigem Verbrauch von Glucose, das Ergebnis der einzelnen Kultivierungsansätze in Abbildung 4.24 dargestellt.

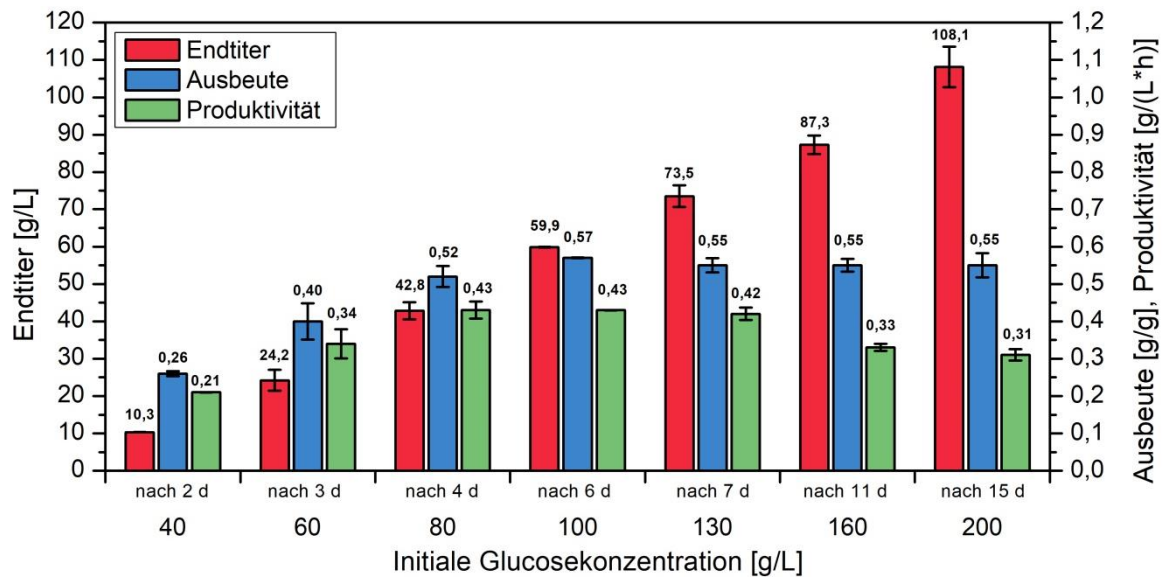


Abbildung 4.24: Einfluss der initialen Glucosekonzentration auf die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO₃.

Ein Vergleich der durchgeführten Kultivierungen untereinander zeigt zunächst, dass mit steigender initialer Glucosekonzentration die Dauer der Kultivierungen zunahm. Zusätzlich konnte mit zunehmender Konzentration an Glucose eine Steigerung des maximal erreichten Endtiters an Fumarsäure detektiert werden. Dabei ermöglichte der Einsatz von 200 g/L Glucose mit 108,1 g/L die bisher höchste Endkonzentration an Fumarsäure in dieser Arbeit. Bezogen auf die Ausbeute und die Produktivität konnte diese Tendenz allerdings nicht bestätigt werden. Vielmehr wurde in Bezug auf diese beiden Prozessparameter ein Optimumsbereich bei 80 - 130 g/L initialer Glucose identifiziert. So wies der Kultivierungsansatz mit 100 g/L Glucose die höchste Ausbeute (0,57 g/g) auf. Mit 0,55 g/g konnte allerdings auch bei Kultivierungen mit höheren Glucosekonzentrationen nur eine minimal geringere Ausbeute detektiert werden. Interessant ist hierbei, dass im Bereich von 130 - 200 g/L eine gleichbleibende Ausbeute auftrat. In Bezug auf die erzielten Produktivitäten konnte im Bereich von 80 - 130 g/L Glucose mit 0,43 bzw. 0,42 g/(L·h) die höchsten Produktivitäten nachgewiesen werden. Eine weitere Steigerung der initialen Glucosekonzentration zeigte dagegen geringere Produktivitäten auf. Als mögliche Ursache für die Beobachtung kann die verlängerte Kultivierungsdauer in Kombination mit der zu diesem Zeitpunkt auftretenden Schädigung der Biomasse angeführt werden (s. Kapitel 4.1.3.1).

Insgesamt konnte in dieser Versuchsreihe aufgezeigt werden, dass eine initiale Glucosekonzentration von 80 - 130 g/L und eine Kultivierungsdauer von 4 - 7 d ideal für die Produktion von Fumarsäure mittels direkter Sporeninokulation waren. Dieses Ergebnis steht dabei in Übereinstimmung mit einer Vielzahl von Publikationen, die zur Produktion von Fumarsäure eine initiale Glucosekonzentration innerhalb dieses Konzentrationsbereichs einsetzen (Roa Engel et al., 2008, Xu et al., 2012). Weiter konnte in Bezug auf die Kontrolle der Morphologie ein kritisches C/N-Verhältnis von ca. 60 - 90 gC/gN identifiziert werden, dass zur Ausbildung der bevorzugten Mycel-Morphologie nicht unterschritten werden sollte. Zusätzlich zeigte der Einsatz von hohen Glucosekonzentrationen zu Beginn der Kultivierung, dass eine Produktion von > 100 g/L Fumarsäure prinzipiell möglich ist. Im Hinblick auf einen möglichst effizienten Kultivierungsprozess bedarf es allerdings noch einer Steigerung der Produktivität.

4.1.4 Referenzkultivierung mit Vorkultur

Bezüglich eines möglichst effizienten Kultivierungsprozess zur Produktion von Fumarsäure weist die in Kapitel 4.1.3 beschriebene Kultivierungsstrategie mit direkter Sporeninokulation noch Optimierungspotenzial auf. So findet beispielweise aufgrund des zunächst erforderlichen Auskeimens der Sporen keine Produktion von Fumarsäure innerhalb der ersten 24 h der Hauptkultur statt. Dies hat negative Auswirkungen auf die Produktivität des gesamten Prozesses. Weiterhin wird für die vollständige Anzucht der Biomasse in einer Hauptkultur Glucose verbraucht, die dem System nicht mehr zur Bildung von Fumarsäure zur Verfügung steht. Dies resultiert in einer potenziell geringeren Ausbeute an Fumarsäure. Um diese systematischen Nachteile zu eliminieren, wird in diesem Kapitel der Einsatz einer Vorkultur zur vorgeschalteten Anzucht von Biomasse und die Auswirkungen auf die anschließende Hauptkultur untersucht.

4.1.4.1 Etablierung einer Vorkulturstrategie

Zur Entwicklung einer geeigneten Vorkultur, die eine effektive Fumarsäureproduktion in der Hauptkultur ermöglicht, kommt der erzielten Morphologie in der Vorkultur eine entscheidende Rolle zu. Da mit dem optimierten Medium C unter Referenzbedingungen bisher Mycel-Morphologie erzielt wurde, die sich gut für die Produktion von Fumarsäure eignete, wurde dieses Medium auch zur Anzucht von Biomasse im Rahmen einer Vorkultur verwendet. Bezogen auf weitere Prozessparameter wurde in mehreren Vorversuchen zunächst der Einfluss der Schüttelkolbengröße (mit und ohne Schikanen) und der Konzentration an Calciumcarbonat (3 oder 50 g/L) untersucht. Die Vorkulturen wurden dabei mit 10^5 Sporen/mL angeimpft, bei 34 °C und 200 rpm für 24 h inkubiert und anschließend die vorliegende Morphologie analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Ansätze mit 300 mL Schüttelkolben (50 mL Kultivierungsvolumen) im Vergleich zu 500 mL Schüttelkolben (100 mL Kultivierungsvolumen) eine stärker agglomerierte Biomasse aufwiesen. Die gleiche Tendenz konnte unter dem Einsatz von Schüttelkolben mit Schikanen festgestellt werden. Dabei verursachte der Einsatz von Schikanen die Ausbildung von Biomasse mit einem erhöhten Grad an Vernetzungen. Bezogen auf die eingesetzte Menge an Calciumcarbonat ist prinzipiell ein vollständiger Verzicht während der Vorkultur, aufgrund der noch nicht einsetzenden Produktion von Säuren, vorstellbar. Vorkulturen mit einer sehr geringen Konzentration von 3 g/L Calciumcarbonat zeigten allerdings das Auftreten von Klumpen auf. Aufgrund dieser qualitativ getroffenen Beobachtungen wurde zur Anzucht von Biomasse mittels einer Vorkultur ein 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen mit 100 mL optimiertem Medium C und 50 g/L Calciumcarbonat (Typ 2 von VWR) verwendet. Somit handelt es sich bei diesen Kultivierungsbedingungen um identische Prozessparameter wie bei der darauf folgenden Hauptkultur.

Um nun die Auswirkungen einer separaten Anzucht der Biomasse mittels Vorkultur auf die Produktion von Fumarsäure in der Hauptkultur zu untersuchen, wurde zunächst eine Vorkultur über 24 h inkubiert. Anschließend wurde ein definiertes Volumen dieser Vorkultur zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Das Inokulationsverhältnis betrug dabei 10 % (v/v, d.h. 10 mL Vorkultur in 90 mL Hauptkulturmedium). Der erzielte Kultivierungsverlauf der Hauptkultur ist in Abbildung 4.25 graphisch dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

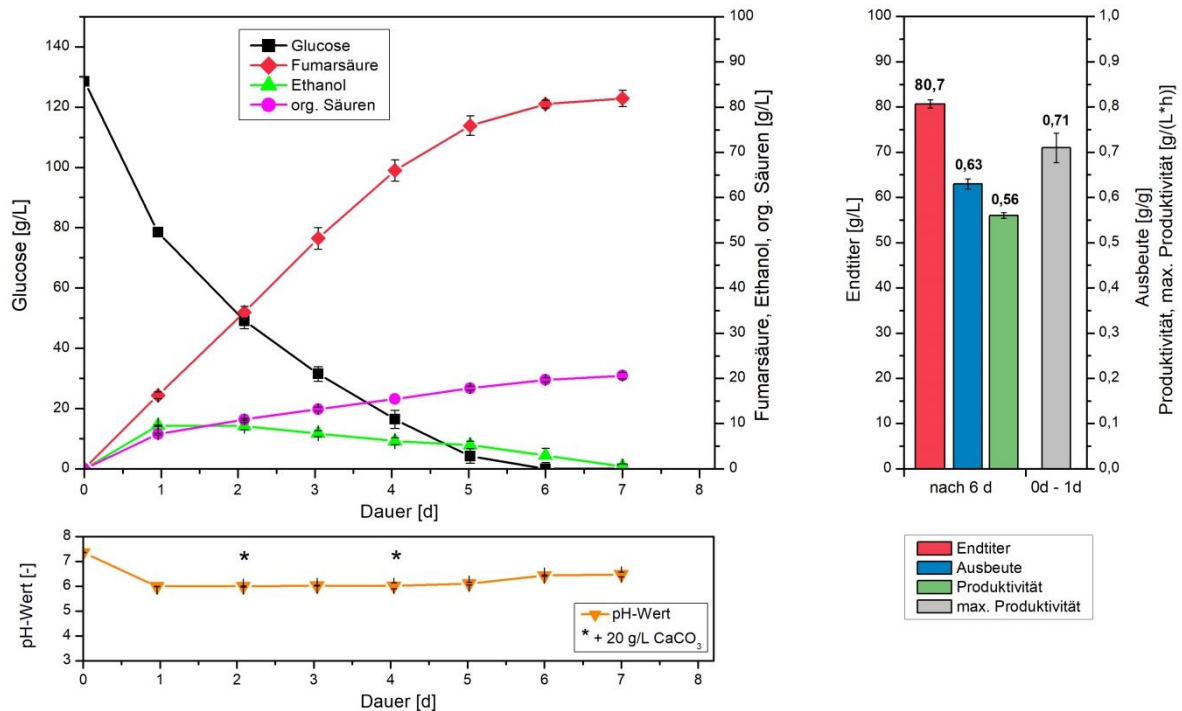


Abbildung 4.25: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2 und 4 d.

Dabei konnte durch die vorgeschaltete Anzucht der Biomasse in einer Vorkultur, das Auftreten einer lag-Phase zu Beginn der Hauptkultur erfolgreich vermieden werden. Erkennbar war dies durch eine hohe Glucoseabnahme innerhalb der ersten 24 h der Hauptkultur, bei gleichzeitig einsetzender Produktion von Fumarsäure. Neben einer Konzentration von 16,3 g/L Fumarsäure konnte zudem die Akkumulation von anderen organischen Säuren und eine maximale Konzentration an Ethanol von 9,5 g/L nach 1 d nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf wies das Kultivierungssystem bis zu einer Kultivierungsdauer von 4 d eine stabile Produktivität an Fumarsäure von 0,70 g/(L·h) auf. Ab diesem Zeitpunkt konnte unter einsetzender Glucoselimitierung ein Rückgang der Produktivität detektiert werden. So konnte nach der vollständigen Verstoffwechslung der vorgelegten Glucose nach 6 d eine Gesamtproduktivität von 0,56 g/(L·h) festgestellt werden. Mit einer Endkonzentration von 80,7 g/L Fumarsäure entspricht dies einer Ausbeute von 0,63 g/g. Bezogen auf die Regulierung des pH-Wertes wurden bei dieser Kultivierung nach 2 d und 4 d jeweils 20 g/L Calciumcarbonat hinzugefügt. Dies ermöglichte einen stabilen pH-Wert von mindestens 6,0 über den gesamten Zeitraum der Kultivierung.

Ein Vergleich der hier erzielten Kultivierungsergebnisse mit der bisher angewendeten Kultivierungsstrategie der direkten Sporeninokulation (vgl. Kapitel 4.1.3) zeigt eine deutliche Verbesserung auf. So konnte durch den Einsatz einer Vorkultur und das Vermeiden einer lag-Phase in der Hauptkultur, die Produktivität um 33 % gesteigert werden. Weiterhin ermöglichte eine um 15 % erhöhte Ausbeute unter Verwendung von 130 g/L initialer Glucose, eine gesteigerte Endkonzentration auf > 80 g/L Fumarsäure. Somit konnte anhand dieses Kultivierungsansatzes erfolgreich aufgezeigt werden, dass eine Auslagerung der Anzucht von Biomasse im Rahmen einer Vorkultur möglich ist. Da die Vorkultur nur 10 % (v/v) des späteren Hauptkulturvolumens einnimmt, stellt dieser Ansatz eine effektive Möglichkeit zur Verbesserung des bisherigen Kultivierungssystems dar.

4.1.4.2 Charakterisierung der Morphologie

Um das Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei Kultivierungen, die mittels Vorkultur angeimpft wurden, qualitativ zu untersuchen, wurden zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten Proben entnommen und diese mikroskopisch bzw. makroskopisch analysiert. Die dabei beobachtete Morphologie ist exemplarisch nach einer Kultivierungsdauer von 3 d in Abbildung 4.26 dargestellt.

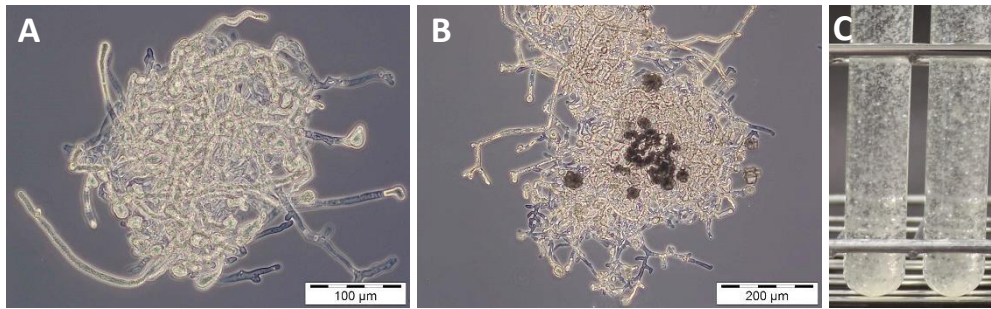


Abbildung 4.26: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit Vorkultur und optimiertem Medium C nach 3 d; A und B - mikroskopische Aufnahme der Mycel-Morphologie, C - makroskopische Aufnahme von Mycelflokkungen.

Da bei dieser Kultivierungsstrategie das Auskeimen der Sporen bereits in einer Vorkultur erfolgte, lagen zu Beginn der Hauptkultur bereits einzelne Mycelflokkungen im Kultivierungsansatz vor. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer konnte qualitativ eine Zunahme der Kompaktheit bei den vorliegenden Mycelflokkungen beobachtet werden. Dabei wiesen vereinzelte Mycelflokkungen sogar die Tendenz auf Calciumcarbonatpartikel im Inneren des Myceliums einzulagern. In Abbildung 4.26, B konnte dies anhand von dunklen Partikeln innerhalb der vorliegenden Biomasse mikroskopisch dokumentiert werden. Da dieses Verhalten bisher nur bei der Ausbildung von kompakten Pellets (s. Kapitel 4.1.1) beobachtet wurde, kann die hier vorliegende Morphologie als Zwischenstufe von reiner Mycel- und Pellet-Morphologie bezeichnet werden. Für diese Annahme spricht außerdem, dass die hier gezeigten Mycelflokkungen im Vergleich zu losem Mycelium qualitativ eine höhere Kompaktheit aufweisen. Somit kann die erzielte Veränderung der Morphologie als eine mögliche Ursache für die gesteigerte Produktion von Fumarsäure angeführt werden.

In diesem Zusammenhang beschreibt Liao et al. (2007), dass das Vorliegen von kompakter Biomasse die allgemeine Viskosität des Kultivierungsansatzes verringert und somit durch einen verbesserten Massen- und Sauerstofftransport die Akkumulation von Fumarsäure begünstigt wird. Bezogen auf diese Aussagen muss allerdings einschränkend hinzugefügt werden, dass es beim Auftreten einer zu dichten Morphologie zu Stofflimitierungen innerhalb der vorliegenden Biomasse kommen kann, die sich negativ auf die Produktion von Fumarsäure auswirkt (Zhou et al., 2000). Ergänzend zu diesen beiden gegensätzlichen Feststellungen untersuchte Zhang et al. (2015) den Einfluss von unterschiedlichen Morphologieformen auf die Produktion von Fumarsäure. Als ideale Wachstumsform wird in dieser Publikation eine Mycel-Morphologie mit einem Durchmesser von ca. 100 µm beschrieben, die vergleichbar zu der hier aufgezeigten Wachstumsform ist.

4.1.4.3 Bestimmung der Biomassekonzentration während der Kultivierung

Um neben der qualitativen Beschreibung der Morphologie auch quantitative Aussagen über die gebildete Menge an Biomasse treffen zu können, wurde die gebildete Konzentration an Biotrockenmasse bestimmt. Hierzu wurde in regelmäßigen Abständen und in Doppelbestimmung die gesamte Biomasse eines Schüttelkolbens zunächst von anderen Feststoffen befreit, getrocknet und anschließend gravimetrisch analysiert. In Abbildung 4.27 sind die erzielten Konzentrationen der Biotrockenmasse zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung graphisch dargestellt. Da neben der Energie- und Kohlenstoffquelle Glucose auch Ammonium und Phosphat essentiell für den Aufbau von Biomasse sind, enthält diese Abbildung ebenfalls den Verlauf dieser Parameter. Die Konzentrationen an Ammonium und Phosphat wurden dabei mittels IC-Analyse bestimmt.

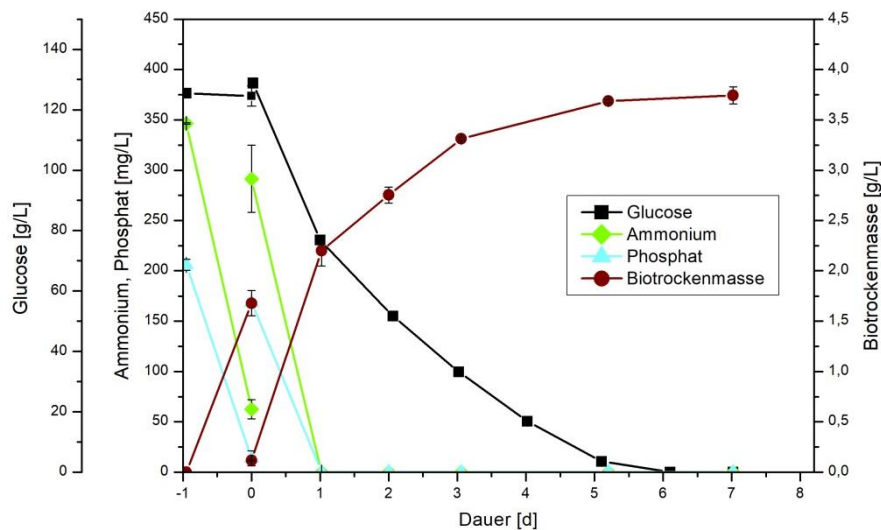


Abbildung 4.27: Verlauf der Konzentrationen von Biotrockenmasse, Ammonium und Phosphat bei der Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2 und 4 d.

Da bei der hier verwendeten Kultivierungsstrategie eine Anzucht der Biomasse in einer separaten Vorkultur erfolgte, wurde zunächst nach 24 h Vorkultur die gebildete Biomasse quantifiziert und in Abbildung 4.27 im Bereich von - 1 d bis 0 d dargestellt. Eine Betrachtung dieses Zeitraums zeigt, dass während der Vorkultur unter minimalem Glucoseverbrauch eine starke Zunahme der Biotrockenmasse auftrat. Dabei konnte innerhalb von 24 h der Aufbau von 1,7 g/L Biotrockenmasse und die fast vollständige Verstoffwechslung der vorgelegten Menge an Ammonium (82 %) und Phosphat (93 %) beobachtet werden. Beim anschließenden Animpfen der Hauptkultur wurde ein Inokulationsverhältnis von 10 % (v/v) verwendet. Dabei konnte zu Beginn der Hauptkultur experimentell eine anfängliche Biomassekonzentration von 0,1 g/L nachgewiesen werden. Weiter konnte innerhalb der ersten 24 h der Hauptkultur, unter vollständigem Aufbrauchen von Ammonium und Phosphat, die höchste Zunahme an Biomasse während der gesamten Kultivierung festgestellt werden. So wurde nach 1 d Hauptkultur eine Biomassekonzentration von 2,2 g/L detektiert. Ein Vergleich dieses Wertes mit der zuvor erzielten Konzentration an Biotrockenmasse nach 1 d Vorkultur zeigt eine Steigerung der Biomassezunahme um ca. 30 % auf. In Bezug auf die Verstoffwechslung von Glucose konnte bei einem Vergleich der Vorkultur mit den ersten 24 h der Hauptkultur ein weiterer Unterschied identifiziert werden. So wies der Verlauf der Hauptkultur einen deutlich gesteigerten Verbrauch von Glucose auf. Begründet werden

kann dies, neben der erhöhten Bildung von Biomasse, durch das Einsetzen der Fumarsäureproduktion innerhalb dieses Zeitraums. Im weiteren Verlauf der Hauptkultur konnte trotz des vollständigen Verbrauchs von Ammonium und Phosphat eine weitere Zunahme der Konzentration an Biotrockenmasse detektiert werden. Da diese beiden Medienkomponenten essentiell für das Wachstum sind, deutet diese Beobachtung auf eine potenzielle intrazelluläre Speicherung hin, die allerdings nicht weiter untersucht wurde. Insgesamt konnte mit fortschreitender Kultivierungsdauer ein Abflachen der Zunahme an Biomasse beobachtet werden. Dabei wurde mit 3,7 g/L die maximale Konzentration an Biotrockenmasse nach 7 d erreicht. Unter Berücksichtigung der in diesem Versuch erzielten Konzentration an Fumarsäure von 82,3 g/L entspricht dies einer biomassespezifischen Ausbeute von 22,2 g/g_{BTM}.

Ein Vergleich dieser Werte mit Literaturangaben zeigt zunächst, dass die hier erzielte Endkonzentration an Biotrockenmasse mit 3,7 g/L in einem durchaus üblichen Bereich (2 - 10 g/L) für Kultivierungen mit *Rhizopus* sp. liegt (Zhou et al., 2000; Zhang et al., 2015). Allerdings deutet ein Vergleich der hier erzielten biomassespezifischen Ausbeute von 22,2 g/g_{BTM} auf ein Kultivierungssystem hin, dass eine gute Substratversorgung der gebildeten Biomasse gewährleistet und somit eine hohe Produktion von Fumarsäure ermöglicht. In diesem Kontext erzielte beispielsweise Gu et al. (2014) mit 4,3 g/L Biotrockenmasse eine biomassespezifischen Ausbeute von 9,5 g/g_{BTM}. Weiter konnte Yu et al. (2012) bei einer Kultivierung mit einer Konzentration von 3,3 g/L Biotrockenmasse eine spezifische Ausbeute von 15,0 g/g_{BTM} erreichen. Mit einer Ausbeute von 22,8 g/g_{BTM} wurde in einer Publikation von Fu et al. (2010) ein Kultivierungssystem beschrieben, das vergleichbare biomassespezifische Ausbeuten erzielt. Da hierbei allerdings nur eine Konzentration an Biotrockenmasse von 2,6 g/L verwendet wurde, verdeutlicht auch diese Publikation das hohe Potenzial des hier untersuchten Kultivierungsansatzes.

4.1.4.4 Löslichkeit von Fumarsäure während der Kultivierung

Analog zu Kultivierungen mit direkter Sporeninokulation konnte auch bei der Kultivierung mit Vorkultur das Ausfallen von nadelförmigen Fumarsäurekristallen während der Hauptkultur beobachtet werden (s. Kapitel 4.1.3.1). Um dabei den genauen Zeitpunkt des Erreichens der Löslichkeitsgrenze festzustellen und die allgemeine Löslichkeit der produzierten Fumarsäure bzw. Calciumfumarat während der Kultivierung zu bestimmen, wurde bei einer Kultivierung, neben der Gesamtkonzentration, auch die Konzentration an gelöster Fumarsäure analysiert. Hierzu wurden Kultivierungsproben entnommen und nach dem Abzentrifugieren von ausgefallenen Fumarsäurekristalle ausschließlich die Konzentration an gelöster Fumarsäure im Überstand detektiert. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 4.28 dargestellt.

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass nach einer Kultivierungsdauer von 1 d mit ca. 16 g/L die gebildete Fumarsäure zunächst ausschließlich in gelöster Form vorlag. Ergänzend hierzu konnten zu diesem Zeitpunkt keine Fumarsäurekristalle im Kultivierungsansatz mikroskopisch nachgewiesen werden. Nach einer Dauer von 2 d wurde dagegen unter einer weiteren Zunahme der Gesamtkonzentration an Fumarsäure auf 34,7 g/L das Ausfallen von nadelförmigen Fumarsäurekristallen detektiert. Begleitet wurde diese Beobachtung von einem Abfallen der Konzentration an gelöster Fumarsäure auf 8,4 g/L, die im weiteren Kultivierungsverlauf nur minimal anstieg. So konnte nach einer Dauer von 7 d eine Konzentration an gelöster Fumarsäure von 10,0 g/L festgestellt werden. Als Grund

für diese geringe Steigerung kann eine Zunahme des pH-Wertes von 6,0 auf 6,5 innerhalb dieses Zeitraums (s. Abbildung 4.25) angeführt werden, der prinzipiell die Löslichkeit von Fumarsäure verbessert (Roa Engel et al., 2011).

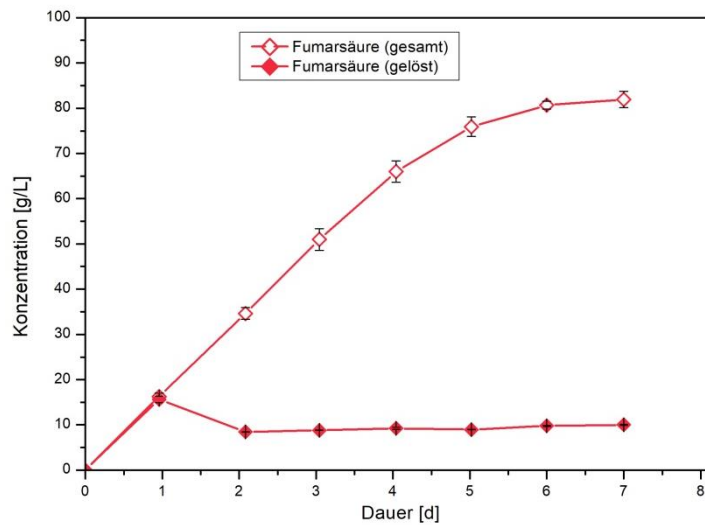


Abbildung 4.28: Löslichkeit von Fumarsäure bei der Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2 und 4 d.

Zusammenfassend konnte somit innerhalb dieses Versuchs zunächst das Auftreten einer überkritischen Konzentration an gelöster Fumarsäure, vor dem Ausfallen von Fumarsäurekristallen, aufgezeigt werden. Belegt wurde diese Annahme durch das Absinken der Konzentration an gelöster Fumarsäure nach 2 d, unter einsetzender Kristallisation von Fumarsäure. Insgesamt wies das Kultivierungssystem nach einer Dauer von 7 d mit 12 % (w/w) nur einen sehr geringen Anteil an gelöster Fumarsäure auf. Somit stellen ausgefallene Fumarsäurekristalle die deutlich größere Fraktion bezogen auf die Gesamtkonzentration dar.

4.1.4.5 Einfluss der Konzentration von Calciumcarbonat

Bei bisher durchgeführten Kultivierungen mit Vorkultur wurde durch eine zweimalige Zugabe von jeweils 20 g/L Calciumcarbonat (2 d und 4 d) ein Absinken des pH-Wertes über den gesamten Kultivierungszeitraum verhindert. Unter Berücksichtigung der initialen Konzentration von 50 g/L Calciumcarbonat wurde somit eine Gesamtkonzentration von 90 g/L verwendet, die eine Produktion von ca. 80 g/L Fumarsäure ermöglichte (s. Kapitel 4.1.4.1). Hinsichtlich einer möglichst effektiven Prozessführung stellt das nicht vollständige Aufbrauchen des eingesetzten Calciumcarbonats noch Optimierungspotenzial dar. Daher wurde zur Untersuchung des Einflusses einer geringeren Gesamtkonzentration an Calciumcarbonat zunächst eine Kultivierung durchgeführt, der nur zu Beginn 50 g/L Calciumcarbonat hinzugefügt wurden. Unter Ausbildung von Mycel-Morphologie ist in Abbildung 4.29 der entsprechende Kultivierungsverlauf dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

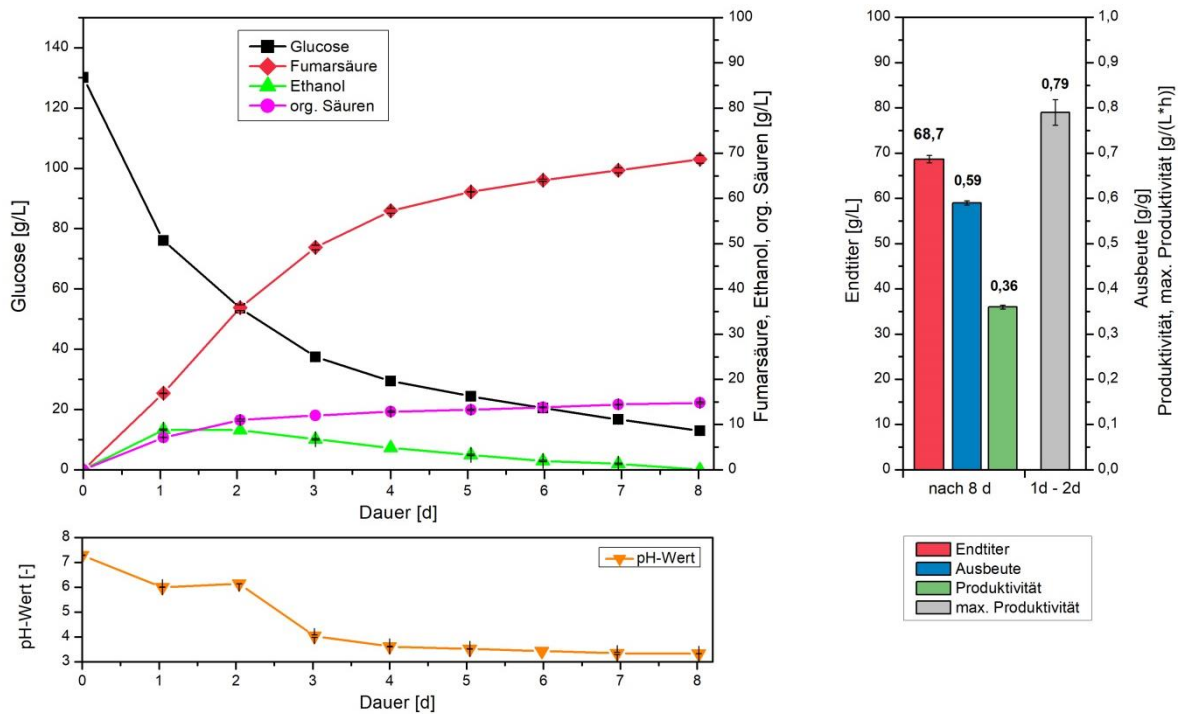


Abbildung 4.29: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR).

Der Kultivierungsverlauf zeigt, dass mit einer Gesamtkonzentration von 50 g/L Calciumcarbonat eine Stabilisierung des pH-Wertes über 2 d möglich war. Innerhalb dieses Zeitraums konnte eine hohe Produktivität und die Akkumulation von 35,9 g/L Fumarsäure detektiert werden. Im weiteren Verlauf wies das Kultivierungssystem, nach dem vollständigen Verbrauch von Calciumcarbonat und dem daraus resultierenden Absinken des pH-Wertes, dagegen einen deutlichen Rückgang der Produktivität an Fumarsäure auf. Begleitet wurde diese Beobachtung von einer reduzierten Verstoffwechselung des Substrats Glucose. So konnten nach einer Kultivierungsdauer von 8 d noch 12,9 g/L Glucose nachgewiesen werden. Mit einer Endkonzentration von lediglich 68,7 g/L Fumarsäure und einer geringen Gesamtproduktivität von 0,36 g/(L·h) konnte somit festgestellt werden, dass das zu frühe Absinken des pH-Wertes den Kultivierungsansatz mit Vorkultur negativ beeinflusst. Dabei steht dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit Kultivierungen, die mit direkter Sporeninokulation durchgeführt wurden (s. Kapitel 4.1.2.9). Ergänzend hierzu beschreibt auch Roa Engel et al. (2011), dass ein zu frühes Aufbrauchen des Calciumcarbonats einen Rückgang der Produktion von Fumarsäure verursacht. In dieser Publikation konnte allerdings auch festgestellt werden, dass ein Abfallen des pH-Wertes zu einem späten Kultivierungszeitpunkt keine negativen Auswirkungen auf das Produktionssystem hat.

Um nun für dieses Kultivierungssystem eine ideale Gesamtkonzentration an Calciumcarbonat festzulegen, wurde eine weitere Kultivierung mit 50 g/L initialem Calciumcarbonat durchgeführt und nach 2 d einmalig 20 g/L Calciumcarbonat hinzugegeben. Der resultierende Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.30 graphisch dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

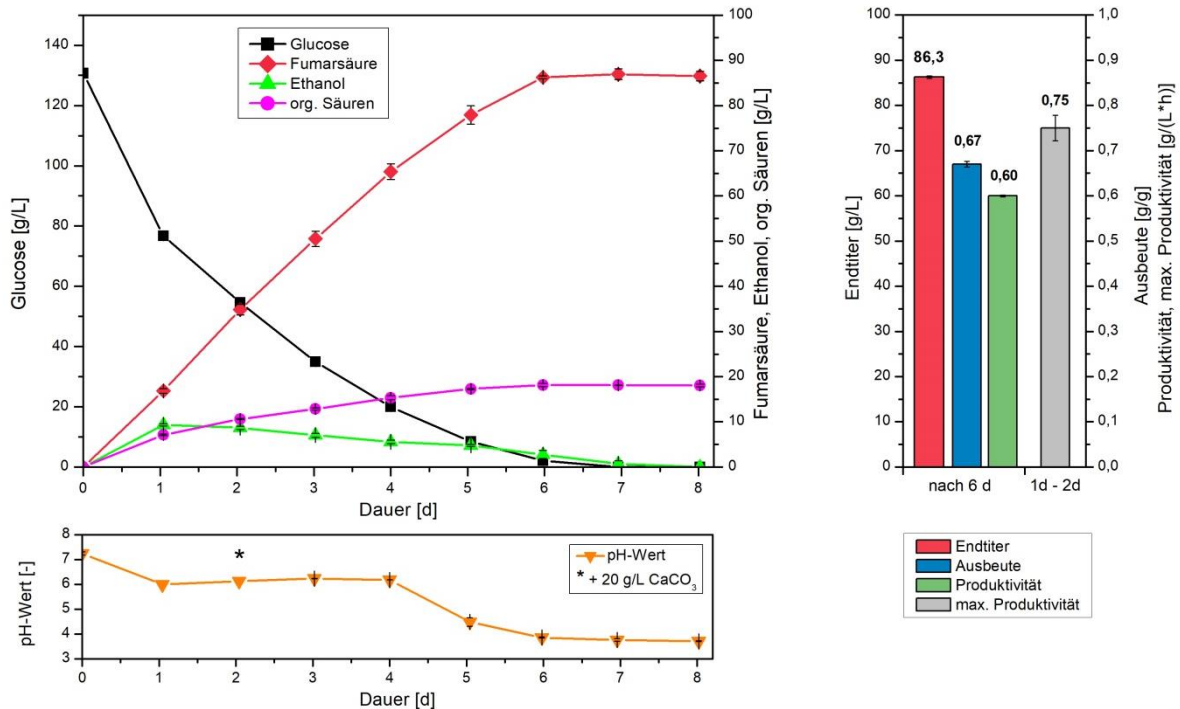


Abbildung 4.30: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2 d.

Durch den Einsatz einer Gesamtkonzentration von 70 g/L Calciumcarbonat konnte über einen Kultivierungszeitraum von insgesamt 4 d ein stabiler pH-Wert von 6,0 - 6,2 gewährleistet werden. Somit konnte erst nach 5 d der vollständige Verbrauch an Calciumcarbonat und ein beginnendes Absinken des pH-Wertes nachgewiesen werden. Bezogen auf die Produktion von Fumarsäure wurde bei dieser Kultivierung eine deutlich gesteigerte Akkumulation festgestellt. So wies das Kultivierungssystem innerhalb der ersten vier Tage eine konstante und hohe Produktivität von ca. 0,70 g/(L·h) auf. Erst mit einsetzender Glucoselimitierung und dem beginnenden Abfallen des pH-Wertes konnte ein geringer Rückgang der Produktivität festgestellt werden. Dabei zeigt ein Vergleich mit der zuvor durchgeführten Kultivierung, dass durch ein Abfallen des pH-Wertes zu einem späteren Kultivierungszeitpunkt die Produktion von Fumarsäure weniger stark beeinflusst wird (vgl. Abbildung 4.29). Als Resultat dieser Beobachtung konnte bei der hier gezeigten Kultivierung ein Endtiter an Fumarsäure von 86,3 g/L festgestellt werden. Es handelt sich hierbei um die höchste Endkonzentration, die in dieser Arbeit bei Schüttelkolbenkultivierungen mit einer initialen Glucosekonzentration von 130 g/L erzielt wurde. Weiterhin verdeutlicht die bisher höchste Gesamtproduktivität von 0,60 g/(L·h), bei einer Ausbeute von 0,67 g/g, das große Potenzial dieses Kultivierungsansatzes. Hinsichtlich der erzielten Ausbeute ist anzumerken, dass eine Ausbeute von > 0,64 g/g nicht mehr ausschließlich durch das Ablaufen des oxidativen Synthesewegs erklärt werden kann. Somit deutet die hier identifizierte Ausbeute von 0,67 g/g erstmals auf eine zumindest anteilige Produktion von Fumarsäure mittels reduktiver Carboxylierung hin (Xu et al., 2012).

Zusammenfassend konnte durch den Einsatz einer einmaligen Zugabe von 20 g/L Calciumcarbonat nach 2 d und einer resultierenden Gesamtkonzentration von 70 g/L Calciumcarbonat das vorliegende Kultivierungssystem weiter optimiert werden. So wurde im Vergleich zur bisher besten Kultivierung mit zweimaliger Zugabe von 20 g/L Calciumcarbonat (90 g/L Gesamtkonzentration) eine Steigerung

des Endtiters um 7 % erzielt. Bezogen auf die Ausbeute konnte eine Verbesserung um 6 %, bei einer Zunahme der Produktivität von 7 % festgestellt werden (vgl. Kapitel 4.1.4.1). Somit liefert die hier untersuchte Reduktion an Calciumcarbonat nicht nur eine verbesserte Produktion von Fumarsäure, sondern ermöglicht zusätzlich eine Einsparung der benötigten Menge an Calciumcarbonat von ca. 25 %.

4.1.5 Produktion von hohen Endkonzentrationen an Fumarsäure

Bei bisherigen Kultivierungen mit Vorkultur wurde zur Produktion von Fumarsäure eine initiale Konzentration an Glucose von 130 g/L verwendet. Wie in Kapitel 4.1.4.5 beschrieben, konnte hierbei unter optimierten Kultivierungsbedingungen ein Endtiter an Fumarsäure von 86,3 g/L erzielt werden. Da in dieser Kultivierung die Produktion von Fumarsäure maßgeblich durch das Aufbrauchen der vorgelegten Menge an Glucose beendet wurde, kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage über die maximal mögliche Endkonzentration an Fumarsäure getroffen werden. Ein Vergleich dieser Endkonzentration mit der Literatur zeigt allerdings auf, dass bereits Kultivierungen mit höheren Konzentrationen an Fumarsäure publiziert wurden. So erzielten beispielsweise Rhodes et al. (1962) und auch Kenealy et al. (1986) jeweils eine Konzentration von ca. 100 g/L Fumarsäure. Die bisher höchste veröffentlichte Konzentration an fermentativ hergestellter Fumarsäure konnte dabei mit 135 g/L in dem Patent von Ling und Ng (1989) gefunden werden. Um nun bei dem hier verwendeten Kultivierungssystem die Endkonzentrationen an Fumarsäure zu steigern, wurde der Einsatz von erhöhten Mengen an Glucose untersucht. Hierzu fanden unterschiedliche Prozessstrategien Verwendung, die in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben werden.

4.1.5.1 Einfluss durch Zugabe von Glucose

Bei der hier verwendeten Prozessstrategie wurde durch mehrmalige Zugabe von Glucose die absolut eingesetzte Konzentration während der Kultivierung erhöht. Die Zugabe von Glucose erfolgte dabei in Form von Feststoff und mit einer Konzentration von jeweils 40 g/L. Zudem wurde der Zeitpunkt der Zugabe so gewählt, dass eine Glucoselimitierung des verwendeten Stammes *R. arrhizus* NRRL 1526 vermieden wurde. Durch regelmäßige Zugabe von Calciumcarbonat wurde außerdem über den gesamten Kultivierungsprozess ein Absinken des pH-Wertes verhindert. In Abbildung 4.31 ist der resultierende Kultivierungsverlauf bei einer initialen Glucosekonzentration von 130 g/L und dreimaliger Zugabe von jeweils 40 g/L Glucose nach 2, 5 und 9 d graphisch dargestellt. Insgesamt wurde in dieser Schüttelkolbenkultivierung eine Gesamtkonzentration von ca. 250 g/L Glucose verwendet.

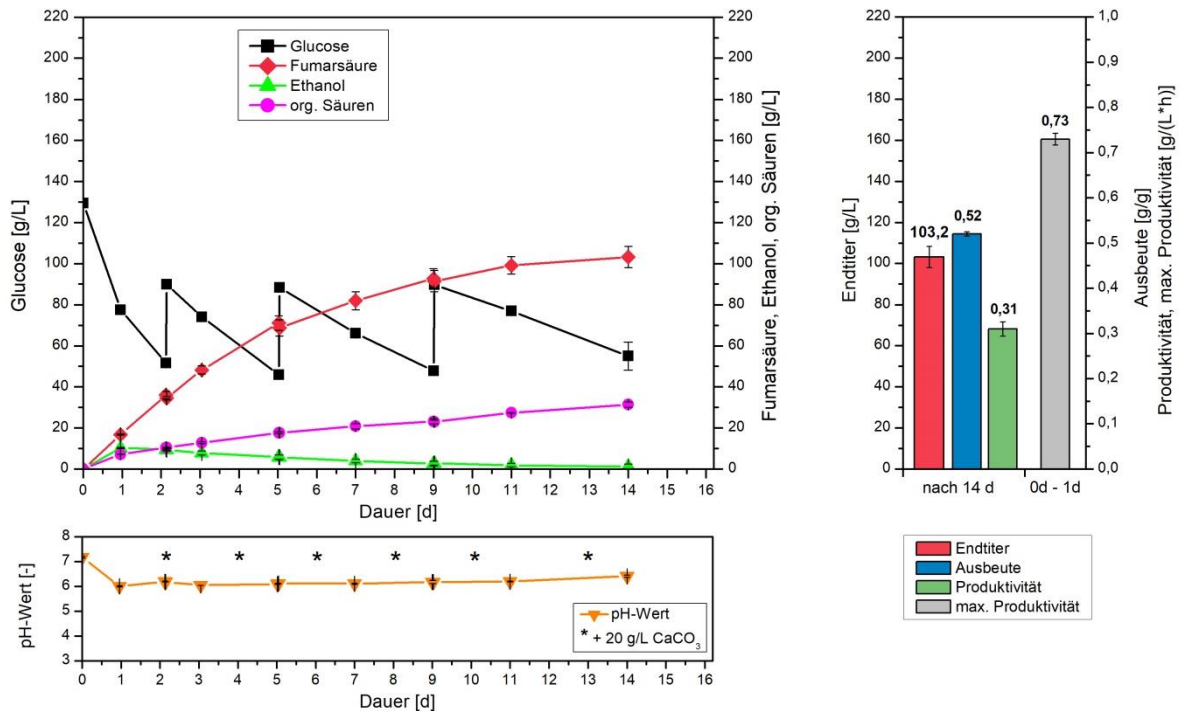


Abbildung 4.31: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C (130 g/L initiale Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); Zugabe von 40 g/L Glucose nach 2, 5 und 9 d; Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2, 4, 6, 8, 10 und 13 d.

Anhand des gezeigten Kultivierungsverlaufs können die Zeitpunkte der Zugabe von Glucose deutlich durch einen sprunghaften Anstieg der Konzentration erkannt werden. Dabei konnte unter kontinuierlichem Verbrauch von Glucose innerhalb von 14 d die nicht vollständige Verstoffwechslung der insgesamt eingesetzten Menge an Glucose festgestellt werden. So wurde bei Beendigung der Kultivierung noch eine Glucosekonzentration von 55,0 g/L detektiert. Bezogen auf die Produktion von Fumarsäure wurde unter Ausbildung von Mycel-Morphologie ein Endtiter von 103,2 g/L nach 14 d erreicht. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,52 g/g, bei einer Produktivität von 0,31 g/(L·h). Als Grund für die hier erzielte geringe Produktivität kann ein Rückgang der Akkumulation von Fumarsäure während der Kultivierung angeführt werden. Dieser nimmt mit fortschreitender Kultivierungsdauer immer weiter zu und verhindert dadurch eine effektive Produktion von Fumarsäure.

Insgesamt konnte somit aufgezeigt werden, dass eine Verstoffwechslung von Glucose auch bei einer nachträglichen Zugabe während der Kultivierung möglich ist. Allerdings eignet sich diese Prozessstrategie ohne weitere Optimierungen nicht für eine effektive Fumarsäureproduktion von Konzentrationen > 100 g/L.

4.1.5.2 Einfluss durch hohe initiale Glucosekonzentrationen

Als eine weitere Möglichkeit wurde in diesem Kapitel der Einfluss einer hohen Glucosekonzentration zu Beginn der Kultivierung untersucht. In diesem Zusammenhang konnte bereits in Kapitel 4.1.3.2 festgestellt werden, dass bei Kultivierungen mit direkter Sporeninokulation der Einsatz einer Startkonzentration von 200 g/L Glucose die Produktion von 108,1 g/L Fumarsäure ermöglichte. Mit einer Kultivierungsdauer von 15 d konnte hierbei allerdings nur eine geringe Produktivität von 0,31 g/(L·h) erzielt werden. Daher wurde dieser Ansatz unter Verwendung der mittlerweile eingesetzten

Kultivierungsstrategie mit Vorkultur erneut untersucht. Der dabei erzielte Kultivierungs-verlauf ist in Abbildung 4.32 dargestellt.

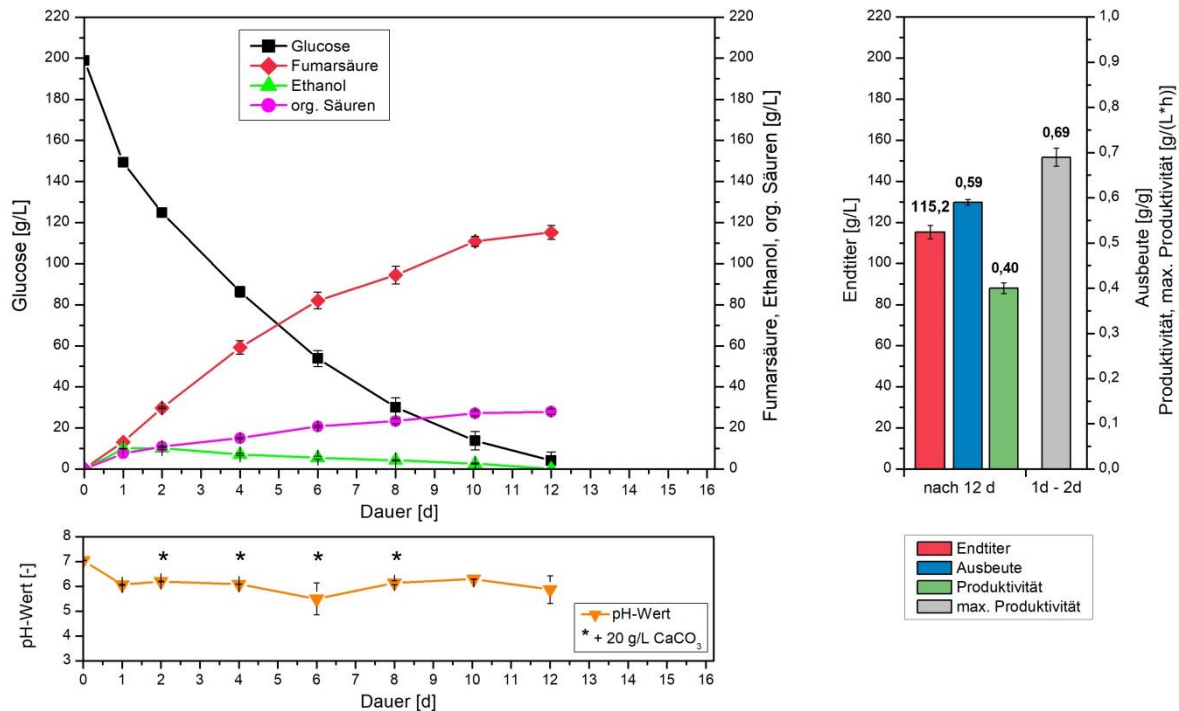


Abbildung 4.32: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C (200 g/L initiale Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2, 4, 6 und 8 d.

Das hier untersuchte Kultivierungssystem ermöglichte innerhalb von 12 d ein fast vollständiges Aufbrauchen der anfänglich vorgelegten Menge an Glucose. Dabei konnte innerhalb dieses Zeitraums die Bildung von 115,2 g/L Fumarsäure, bei einer Ausbeute von 0,59 g/g und einer Produktivität von 0,40 g/(L·h) nachgewiesen werden. Ein Vergleich dieses Ergebnisses mit der zuvor erwähnten Kultivierung mit direkter Sporeninokulation zeigt zunächst, dass auch unter Einsatz einer hohen Glucosekonzentration mittels Vorkultur höhere Endtiter an Fumarsäure und Produktivitäten erzielt werden können. Außerdem deutet ein Vergleich mit der zuvor durchgeführten Kultivierung mit einer geringeren Startkonzentration und mehrmaligen Zugabe von Glucose auf eine Verbesserung der Produktionseigenschaften hin. So konnte beispielsweise eine um 29 % gesteigerte Produktivität bezogen auf den Gesamtprozess nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.1.5.1).

Trotz dieser Verbesserung deutete auch bei dieser Kultivierung ein Auslaufen der Zunahme an Fumarsäure auf nicht ideale Kultivierungsbedingungen hin. Da diese Tendenz mit fortschreitender Kultivierungsdauer zunahm, kann an dieser Stelle die bereits in Kapitel 4.1.3.1 ausführlich diskutierte Veränderung der Morphologie als mögliche Ursache angeführt werden. So konnte auch bei dieser Kultivierung das Auftreten von Verdickungen und Kapseln innerhalb des Myceliums aufgezeigt werden, das auf eine Schädigung der vorliegenden Biomasse hindeutet (El Ghaouth et al., 1992). Zur Veranschaulichung dieser Aussage ist in Abbildung 4.33 die erzielte Morphologie nach eine Kultivierungsdauer von 8 d dargestellt.

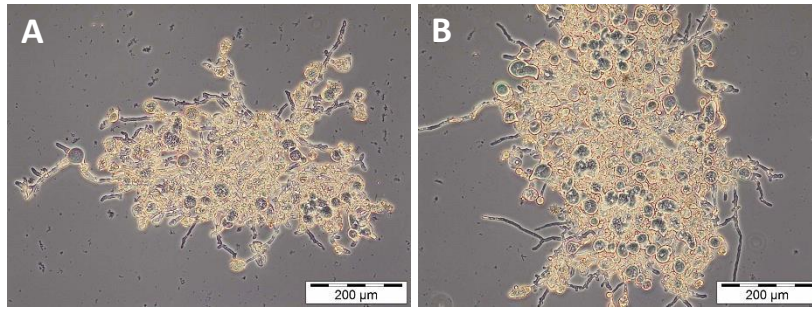


Abbildung 4.33: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit Vorkultur und optimiertem Medium C (200 g/L initiale Glucose) nach 8 d; A und B - mikroskopische Aufnahme der Mycel-Morphologie.

4.1.5.3 Einfluss durch Zugabe von Glucose und Ammonium

Bei den zwei bisher gezeigten Kultivierungen konnte weder durch die zusätzliche Zugabe von Glucose noch durch den Einsatz einer hohen Startkonzentration an Glucose ein effektives Kultivierungssystem aufgezeigt werden, das die Produktion von hohen Endkonzentrationen ermöglichte. Dabei stellte sich vor allem der Rückgang der Produktivität mit fortschreitender Kultivierungsdauer als problematisch dar. Als eine mögliche Ursache für diese Feststellung konnte hierbei eine Alterung bzw. Schädigung der gebildeten Biomasse mit zunehmender Dauer identifiziert werden. Um trotz dieser Tatsache effektive Kultivierungen durchzuführen, die eine Verstoffwechselung von hohen Gesamtkonzentrationen an Glucose ermöglichen und daher eine lange Kultivierungsdauer aufweisen, wurde die Möglichkeit einer zusätzlichen Wachstumsphase in Betracht gezogen. In diesem Zusammenhang wurde angenommen, dass eine zusätzliche Ausbildung von frischer Biomasse zu einem fortgeschrittenen Kultivierungszeitraum potenziell die Produktivität verbessern kann. Zudem wurde bereits in dieser Arbeit der große Einfluss von Ammonium auf die qualitative und quantitative Ausbildung von Biomasse aufgezeigt (s. Kapitel 4.1.2.7 und Kapitel 4.1.3.2). Somit stellt eine Zugabe von Ammonium während der Kultivierung einen interessanten Ansatz dar, der prinzipiell eine weitere Wachstumsphase ermöglicht.

Zur Untersuchung dieser Annahmen wurden vielversprechende Vorversuche durchgeführt, die unterschiedliche Zeitpunkte und Konzentrationen an zugegebener Glucose bzw. Ammonium aufwiesen. Dabei konnte das allgemeine Verständnis des Zusammenspiels von gebildeter Biomasse und der Produktion von Fumarsäure weiter verbessert werden. Insgesamt resultierten die gewonnenen Erkenntnisse in folgenden Regeln zum Durchführen einer Kultivierung, die eine Produktion von hohen Endkonzentrationen an Fumarsäure ermöglichten:

- Die Zugabe von Glucose erfolgt in Form von Feststoff und mit einer jeweiligen Konzentration von 80 g/L, bevor eine Glucoselimitierung einsetzt.
- Bei einer Zugabe von Glucose wird dem Kultivierungssystem ebenfalls 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hinzugefügt.
- Bei einer Abnahme der Glucoseverbrauchsrate, werden dem Kultivierungssystem zusätzlich 0,6 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hinzugefügt.

Ergebnisse und Diskussion

- Die Zugabe von weiteren Medienkomponenten wie Phosphat oder Spurenelementen ist während der Kultivierung nicht notwendig.
- Durch eine regelmäßige Zugabe von Calciumcarbonat wird der pH-Wert über den gesamten Kultivierungszeitraum reguliert.

Unter Anwendung dieser Prozessregeln wurde zunächst eine Kultivierung mit einer initialen Glucosekonzentration von 130 g/L durchgeführt und in Abbildung 4.34 dargestellt. Dabei ermöglichte die zweimalige Zugabe von jeweils 80 g/L Glucose nach 3 d und 6 d den Einsatz einer Gesamtkonzentration von 290 g/L Glucose.

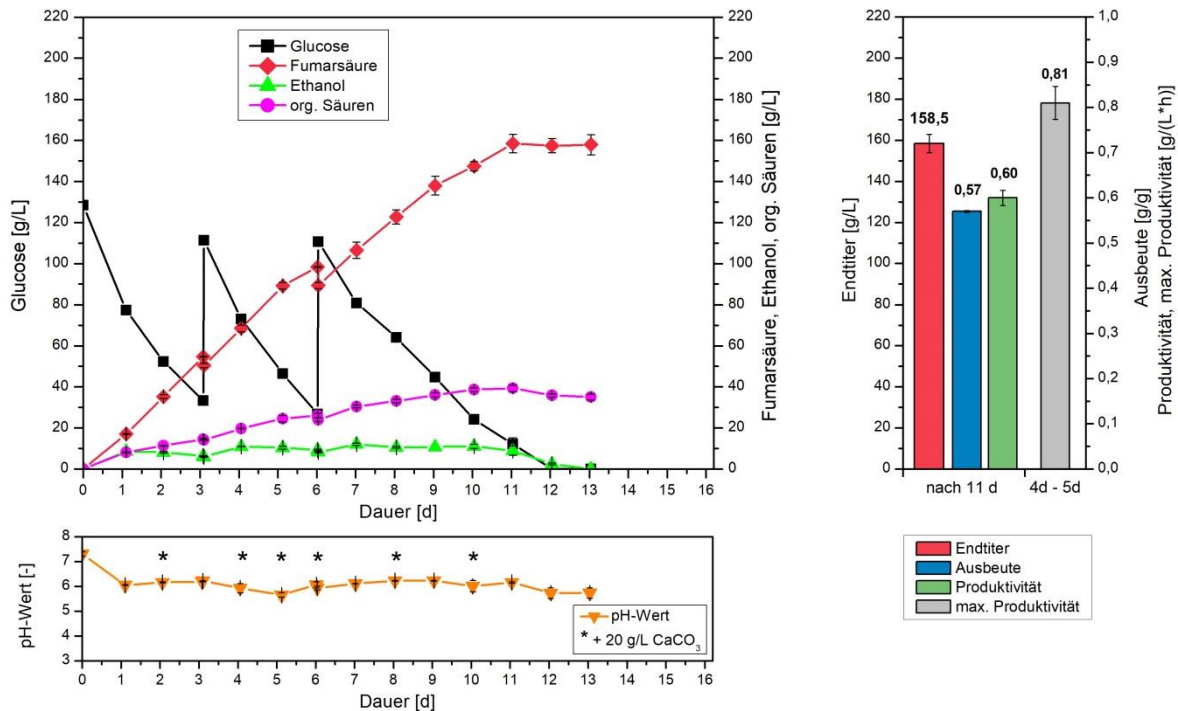


Abbildung 4.34: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C (130 g/L initiale Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); Zugabe von 80 g/L Glucose nach 3 und 6 d; Zugabe von 1,2 g/L (NH₄)₂SO₄ nach 3 und 6 d; Zugabe von 0,6 g/L (NH₄)₂SO₄ nach 8 d; Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2, 4, 5, 6, 8 und 10 d.

Der Kultivierungsverlauf zeigt, dass durch eine kombinierte Zugabe von 80 g/L Glucose und 1,2 g/L (NH₄)₂SO₄ eine effektive Verstoffwechselung von Glucose möglich war. So konnte nach der erstmaligen Zugabe von Glucose eine fast identische Abnahme der Glucosekonzentration im Vergleich zum anfänglichen Verlauf der Kultivierung beobachtet werden. Bei der zweiten Zugabe von Glucose und Ammonium nach 6 d konnte dagegen eine abnehmende Glucoseverbrauchsrate zwischen dem siebten und achten Tag festgestellt werden. Daher wurden dem Kultivierungssystem zu diesem Zeitpunkt zusätzlich 0,6 g/L (NH₄)₂SO₄ zugegeben. Dies ermöglichte eine vollständige Verstoffwechselung der insgesamt eingesetzten 290 g/L Glucose nach 12 d. Bezogen auf das Produktionsverhalten konnte während der Kultivierung eine kontinuierliche Zunahme von Fumarsäure detektiert werden. Dies resultierte nach einer Kultivierungsdauer von 11 d in einem maximalen Endtiter von 158,5 g/L Fumarsäure, bei einer Ausbeute 0,57 g/g und einer Gesamtproduktivität von 0,60 g/(L·h). In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die maximale Produktivität (0,81 g/(L·h)) nicht wie bisher zu Beginn der Kultivierung erreicht wurde, sondern zwischen dem vierten und fünften Tag. Diese

Feststellung verdeutlicht das hohe Potential einer zusätzlichen Wachstumsphase auf die Produktion von Fumarsäure. Auch bei der Bildung von Ethanol und anderen organischen Säuren (Äpfelsäure und Bernsteinsäure) konnte ein verändertes Akkumulationsverhalten identifiziert werden. So zeigte beispielsweise der Verlauf von Ethanol nach der Zugabe von Ammonium jeweils eine Zunahme der Konzentration auf. Da eine Zunahme der Konzentration an Ethanol bisher nur in Verbindung mit starkem Biomassewachstum auftrat (s. Kapitel 4.1.3), kann diese Beobachtung als indirekter Beweis für das Vorliegen weiterer Wachstumsphasen angeführt werden.

Bezogen auf die erzielte Morphologie konnte zunächst das Vorliegen von einzelnen Mycelflocken beobachtet werden. Dabei wies die mikroskopisch untersuchte Biomasse nach einer Kultivierungsdauer von 5 d neben Kapseln und Verdickungen eine auffällig hohe Anzahl an Verzweigungen im vorderen Bereich der Hyphen auf (s. Abbildung 4.35, A). Da diese Beobachtung erst nach der Zugabe von Ammonium gemacht wurde, könnte es sich hierbei um neu gebildete Hyphenarme gehandelt haben, die noch keine Schädigung der Zellhülle aufwiesen. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer und weiterer Zugabe von Ammonium wurde eine Zunahme der Kompaktheit der Mycelflocken beobachtet (s. Abbildung 4.35, B). Außerdem konnte makroskopisch das Zusammenlagern einzelner Mycelflocken zu größeren Agglomeraten nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.35, C). Dabei zeigte die vorliegende Biomasse allerdings bis zum Ende der Kultivierung keine Tendenzen der Klumpenbildung auf.

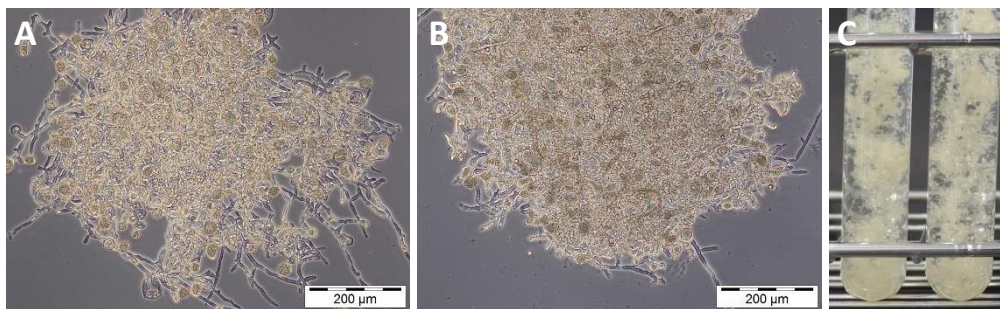


Abbildung 4.35: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit Vorkultur, optimiertem Medium C (130 g/L initiale Glucose) und Zugabe von Glucose und Ammonium; A - mikroskopische Aufnahme nach 5 d, B und C - Aufnahme nach 12 d.

Zusammenfassend konnte unter Anwendung der hier erwähnten Prozessregeln erfolgreich eine Kultivierung durchgeführt werden, die eine Produktion von 158,5 g/L Fumarsäure innerhalb von 11 d ermöglicht. Ein Vergleich der dabei erzielten Ausbeute von 0,57 g/g mit der Ausbeute, die bei einer Kultivierung ohne Zugabe von Glucose und Ammonium erzielt werden konnte (0,67 g/g, s. Kapitel 4.1.4.5), zeigt eine Abnahme um 18 % auf. Als Grund für diesen Rückgang kann ein zusätzlicher Verbrauch an Glucose zum Aufbau von Biomasse bei der Zugabe von Ammonium angeführt werden. Folglich steht dem Kultivierungssystem anteilig weniger Glucose zur Produktion von Fumarsäure zur Verfügung. Allerdings zeigt ein Vergleich der hier erzielten Gesamtproduktivität von 0,60 g/(L·h) mit der Referenzkultivierung, ohne zusätzliche Zugabe von Glucose und Ammonium, eine identische Produktivität auf. Diese Tatsache bestätigt das große Potenzial dieser Prozessstrategie und verdeutlicht die hohe Effizienz bei der Produktion von Fumarsäure über lange Kultivierungszeiträume.

Um ergänzend zu diesem Kultivierungsergebnis den Einfluss einer noch höheren Gesamtkonzentration an Glucose zu untersuchen, wurde eine Kultivierung mit einer initialen Glucosekonzentration von 200 g/L durchgeführt. Zusätzlich wurden dem Kultivierungssystem nach einer Dauer von 7 d und 9 d

jeweils 80 g/L Glucose hinzugegeben. Insgesamt stand somit eine Gesamtkonzentration von 360 g/L Glucose zur Produktion von Fumarsäure zur Verfügung. Der entsprechende Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.36 graphisch dargestellt.

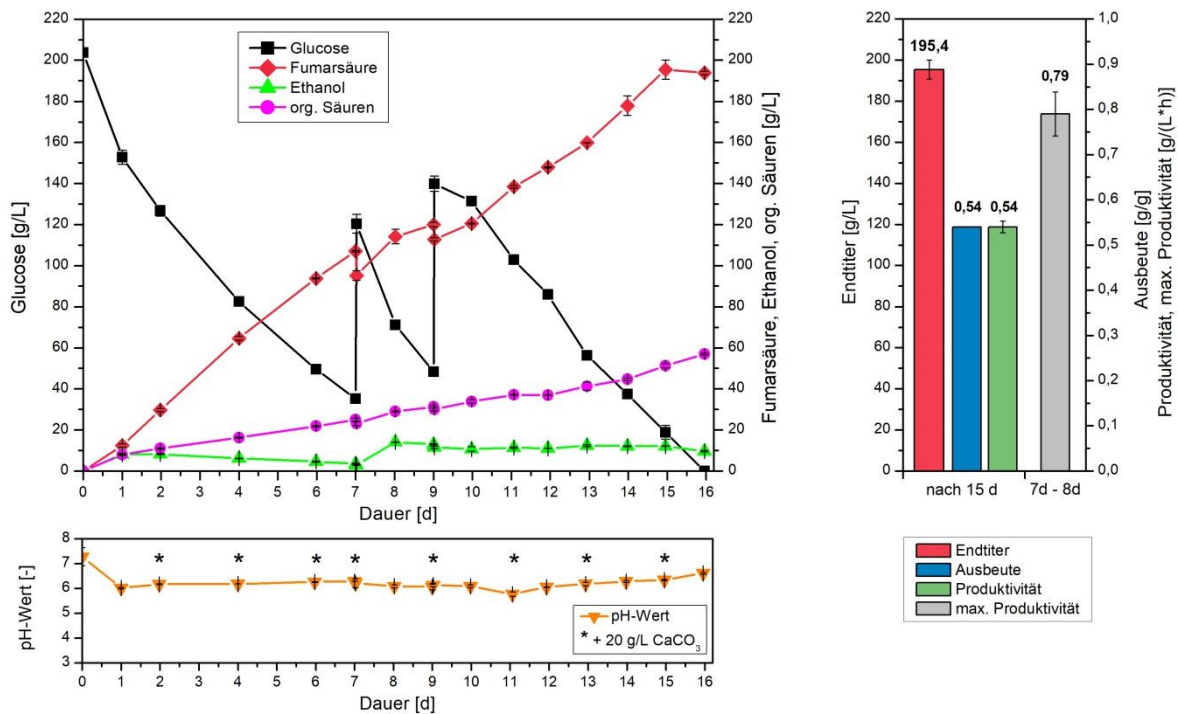


Abbildung 4.36: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C (200 g/L initiale Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); Zugabe von 80 g/L Glucose nach 7 und 9 d; Zugabe von 1,2 g/L (NH₄)₂SO₄ nach 7 d; Zugabe von 0,6 g/L (NH₄)₂SO₄ nach 10, 12 und 14 d; Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13 und 15 d.

Dabei ermöglichte der Einsatz einer hohen Startkonzentration an Glucose zunächst, ohne einen weiteren Eingriff in das Kultivierungssystem, eine konstante Produktion von 107,0 g/L Fumarsäure innerhalb von 7 d. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Schüttelkolbenkultivierung 80 g/L Glucose und 1,2 g/L (NH₄)₂SO₄ zugegeben. In den zwei darauf folgenden Tagen konnte unter hoher Abnahme der Glucosekonzentration nur eine geringfügige Zunahme der absoluten Konzentration an Fumarsäure festgestellt werden. Allerdings wies das Kultivierungssystem in diesem Zeitraum eine deutlich gesteigerte Akkumulation an Ethanol auf, die nach 8 d mit 14,1 g/L ein Maximum erreichte. Daher wurde bei der zweiten Zugabe von 80 g/L Glucose, abweichend zu den zuvor definierten Kultivierungsregeln, auf eine Zugabe von zusätzlichem Ammonium verzichtet. Als Resultat dieser Anpassung konnte zwischen dem neunten und zehnten Tag der Kultivierung nur ein geringer Glucoseverbrauch und eine geringe Produktivität an Fumarsäure detektiert werden. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken, wurde dem Kultivierungssystem nach 10 d, 12 d und 14 d jeweils eine Konzentration von 0,6 g/L (NH₄)₂SO₄ hinzugegeben. Durch diese Maßnahme konnte unter gesteigertem Glucoseverbrauch ein vollständiges Aufbrauchen der insgesamt eingesetzten Menge an Glucose nach 16 d dokumentiert werden. Bezogen auf die Produktion von Fumarsäure konnte hierbei nach einer Dauer von 15 d eine maximale Konzentration von 195,4 g/L identifiziert werden.

Dies entspricht einer Ausbeute von 0,54 g/g, bei einer Gesamtproduktivität von 0,54 g/(L·h). Anzumerken ist hierbei, dass das Kultivierungssystem im Vergleich zur vorherigen Kultivierung

(s. Abbildung 4.34) zwar eine um 6 % geringere Ausbeute und eine um 11 % reduzierte Gesamtproduktivität aufwies. Allerdings verdeutlichen sehr hohe Produktivitäten zu späten Kultivierungszeitpunkten, dass auch bei Konzentrationen von > 150 g/L Fumarsäure noch eine effektive Produktion von Fumarsäure möglich war. So konnten beispielsweise Produktivitäten von $0,72$ g/(L·h) (13 - 14 d) bzw. $0,74$ g/(L·h) (14 - 15 d) am Ende der Kultivierung nachgewiesen werden.

Bezogen auf die erzielte Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 konnte auch bei dieser Kultivierung die Ausbildung von Mycelium dokumentiert werden. Dabei wurde mit fortschreitender Kultivierungsdauer ebenfalls das Zusammenlagern einzelner Mycelflocken zu größeren Agglomeraten beobachtet. Ergänzend hierzu konnte bei mikroskopischen Aufnahmen des Kultivierungsansatzes eine weitere Kristallstruktur von Fumarsäure bzw. den Salzen der Fumarsäure identifiziert werden. So traten bei Konzentrationen von > 120 g/L Fumarsäure, neben kleinen nadelförmigen Kristallen, auch rhombisch geformte, längliche Kristalle mit einer Größe von bis zu $100\text{ }\mu\text{m}$ auf (s. Abbildung 4.37). Bezüglich möglicher Ursachen für die veränderte Kristallbildung wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

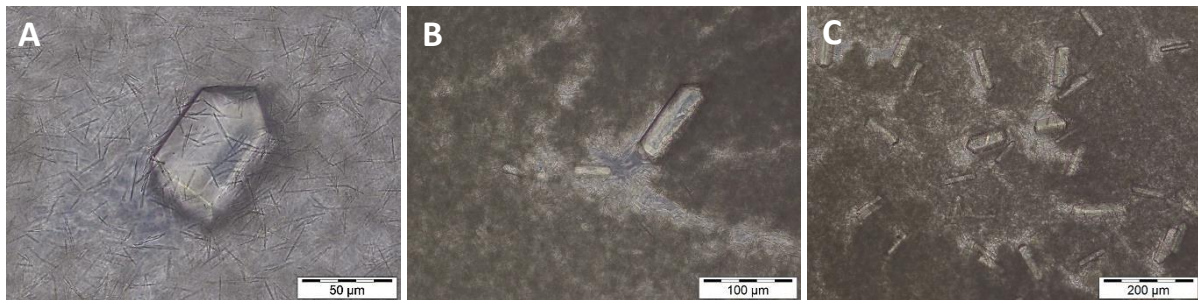


Abbildung 4.37: Kristallstruktur von Fumarsäure bei der Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit Vorkultur, optimiertem Medium C (200 g/L initiale Glucose) und Zugabe von Glucose und Ammonium; A - mikroskopische Aufnahme nach 11 d, B und C - mikroskopische Aufnahme nach 14 d.

Zusammenfassend konnte bei beiden Kultivierungen erfolgreich aufgezeigt werden, dass unter Anwendung der hier definierten Kultivierungsregeln eine effektive Produktion von hohen Endkonzentrationen möglich ist. Dabei liefert eine kombinierte Zugabe von Glucose und Ammonium eine vielversprechende Möglichkeit, neue Biomasse während der Kultivierung aufzubauen und somit über lange Kultivierungszeiträume konstant Fumarsäure zu produzieren. Wie dargestellt, resultierte dies in sehr hohen Endtitern an Fumarsäure von $158,5$ g/L bzw. $195,4$ g/L. Dabei handelt es sich um die höchsten biotechnologisch hergestellten Konzentrationen an Fumarsäure, die nach aktuellem Wissensstand publiziert wurden. Außerdem verdeutlicht eine nur geringfügige Abnahme der Ausbeute und Produktivität gegenüber der Referenzkultivierung (ohne Zugabe von Glucose und Ammonium, vgl. Kapitel 4.1.4.5), das hohe Potential dieses Kultivierungsansatzes.

4.1.6 Produktion von Fumarsäure in 1 L-Reaktoren

Bei bisherigen Kultivierungen wurden ausschließlich Schüttelkolben zur Produktion von Fumarsäure verwendet. Dies erlaubte eine hohe Anzahl an parallelen Versuchen und ermöglichte dadurch eine effektive Optimierung des verwendeten Mediums und verschiedener Prozessparameter. Neben diesem großen Vorteil weisen Schüttelkolbenkultivierungen allerdings auch eine systembedingte Limitierung der Sauerstoffversorgung auf. So wurde bei allen bisher durchgeführten Kultivierungen in Schüttelkolben die Akkumulation von Ethanol während des Aufbaus von Biomasse aufgezeigt. Als Grund für diese Feststellung kann die Art des Sauerstoffeintrags in das Medium angeführt werden. Dieser erfolgt ausschließlich über Diffusion von Luftsauerstoff in die Flüssigphase. Da hierbei die vorliegende Phasengrenze gegenüber dem Kultivierungsvolumen gering ist, kann der hohe Sauerstoffbedarf während der Wachstumsphase nicht vollständig gedeckt werden und resultiert somit in der Bildung des Nebenproduktes Ethanol.

Um das Problem des zu geringen Sauerstoffeintrags zu lösen, wurden Kultivierungen in 1 L-Reaktoren anstelle von Schüttelkolben durchgeführt. Hierbei ermöglichte der Einsatz von Reaktoren eine aktive Begasung des Kultivierungsansatzes mit kleinen Luftblasen. In Abhängigkeit von der eingestellten Begasungsrate und Rührerdrehzahl konnte dabei eine größere spezifische Phasengrenzfläche erzeugt werden, die prinzipiell eine verbesserte Sauerstoffversorgung ermöglichte. Neben diesem Unterschied stellte der Einsatz von 1 L-Reaktoren außerdem einen ersten und somit wichtigen Schritt hinsichtlich eines Scale-ups dar, der essentiell für eine Anwendung in industriellen Maßstäben ist.

4.1.6.1 Kultivierung mit direkter Sporeninokulation im 1 L-Reaktor

In diesem Kapitel wurde zunächst eine Übertragung der in Kapitel 4.1.3 durchgeführten Schüttelkolbenkultivierung mit direkter Sporeninokulation untersucht. Hierzu wurden 600 mL optimiertes Medium C und 50 g/L Calciumcarbonat (Typ 2 von VWR) in einen 1 L-Reaktor vorgelegt und mit 10^5 Sporen/mL angeimpft. Die anschließende Kultivierung erfolgte bei 34 °C, einer Rührerdrehzahl von 400 rpm und einer Begasungsrate von 6,0 L/h (Luft). Abweichend zur Referenzkultivierung im Schüttelkolben wurde hierbei auf die Zugabe von zusätzlichem Calciumcarbonat während der Kultivierung verzichtet. Zur Überprüfung des pH-Wertes und der gelösten Sauerstoffkonzentration wurde eine pH- und pO_2 -Elektrode im Reaktor eingesetzt. Der erzielte Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.38 dargestellt. Ergänzend hierzu ist in Abbildung 4.39 die aufgetretene Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 während der Reaktorkultivierung abgebildet.

Ergebnisse und Diskussion

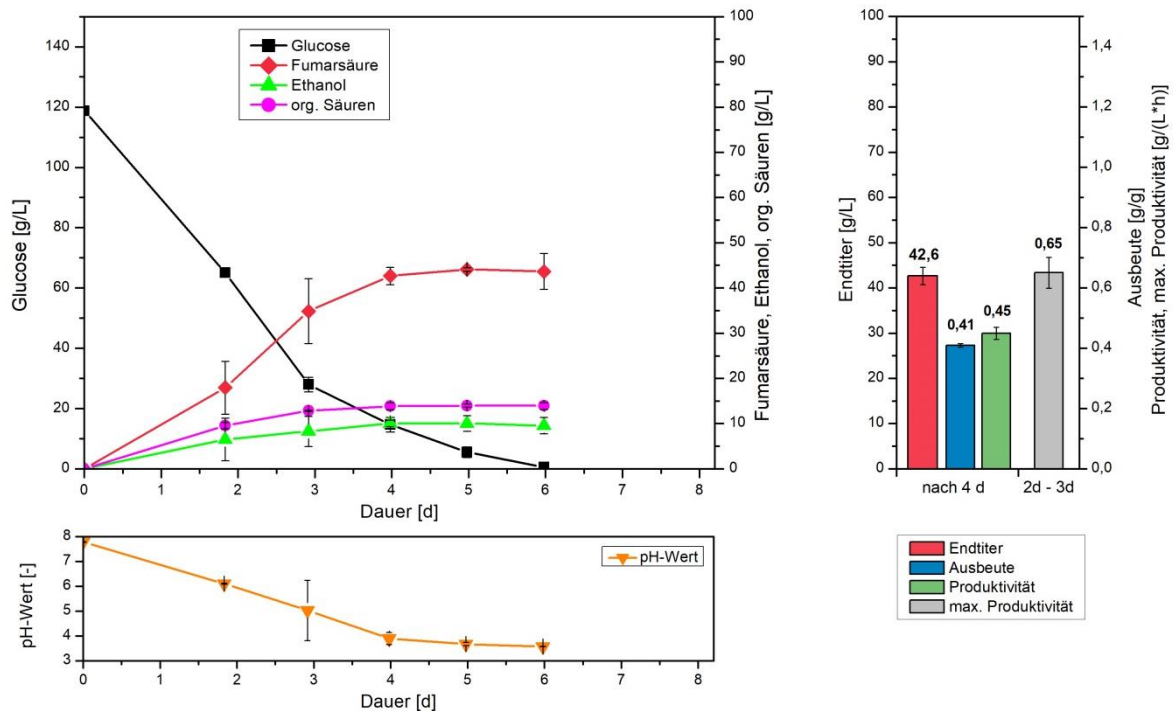


Abbildung 4.38: Reaktorkultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C bei 34 °C, 400 rpm, 6,0 L/h (Luft) und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) ohne weitere Zugabe von CaCO₃; 1 L-Reaktoren mit pH- und pO₂-Elektroden.

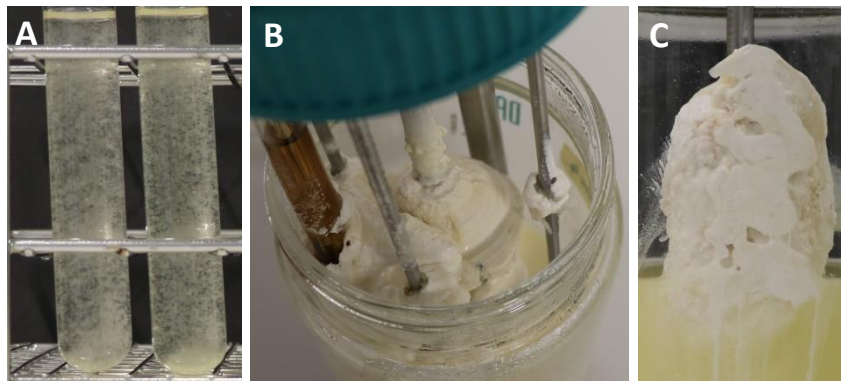


Abbildung 4.39: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Reaktorkultivierung mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C; A - makroskopische Aufnahme der Mycel-Morphologie nach 3 d, B - Aufnahme der bewachsenen Reaktoreinbauten nach 6 d, C - Aufnahme der bewachsenen Begasungsfritte nach 6 d.

Die hier dargestellte Kultivierung zeigt zunächst auf, dass mit einer direkten Sporeninokulation auch im Reaktor ein Auskeimen der Sporen und die anschließende Ausbildung von Mycel-Morphologie möglich war (s. Abbildung 4.39, A). Begleitend hierzu konnte unter Verbrauch von Glucose auch die Produktion von Fumarsäure detektiert werden. Allerdings deutete eine sehr hohe Standardabweichung bei der Fumarsäurekonzentration nach 2 d bzw. 3 d auf ein ungleichmäßiges Produktionsverhalten hin. Verdeutlicht wird diese Feststellung ebenfalls durch ein unterschiedliches Aufbrauchen des vorgelegten Calciumcarbonats nach 2 d bzw. 3 d, das anhand der hohen Standardabweichung des pH-Wertes nach 3 d belegt werden konnte. Insgesamt ermöglichte die hier gezeigte Kultivierung unter nicht vollständiger Verstoffwechslung von Glucose einen Endtiter von 42,6 g/L Fumarsäure nach 4 d. Im weiteren Verlauf der Kultivierung konnte zwar das Aufbrauchen der restlichen Glucose nach zwei weiteren Tagen dokumentiert werden. Dies resultierte allerdings nicht in einer Zunahme der Konzentration an

Fumarsäure. Als Grund für die im Vergleich zur entsprechenden Schüttelkolben-kultivierung geringeren Fumarsäureproduktion kann das allgemeine Wachstumsverhalten von *R. arrhizus* NRRL 1526 im Reaktor angeführt werden. So konnte neben der bereits beschriebenen Mycel-Morphologie ebenfalls ein massiver Bewuchs der Reaktoreinbauten nachgewiesen werden. Abbildung 4.39, B zeigt in diesem Zusammenhang den vollständigen Einschluss des Rührers mit Biomasse und darin gebundenem Calciumcarbonat. Außerdem konnte eine Anlagerung der Biomasse an den eingesetzten Elektroden aufgezeigt werden, die eine Online-Messung des pH-Wertes und auch des gelösten Sauerstoffs ab einer Kultivierungsdauer von 1 d verhinderte.

Besonders kritisch ist das Biomassewachstum an der Begasungsfritte zu bewerten (s. Abbildung 4.39, C). Dies resultierte zum einen in einer Abnahme der Anzahl an Öffnungen über die Luft in das Medium abgegeben wurde. So konnte mit zunehmender Kultivierungsdauer das Aufsteigen von weniger und größeren Luftblasen beobachtet werden. Zum anderen wurde ab einer Kultivierungsdauer von 2 d ein konstanter Rückgang der Begasungsrate dokumentiert. So war beispielsweise nach 4 d nur noch eine Luftzufuhr von maximal 0,8 L/h möglich. Nach 6 d betrug die maximal mögliche Begasungsrate lediglich 0,2 L/h. Als Resultat dieser zunehmend geringer werdenden Luftzufuhr konnte während der Kultivierung eine steigende Konzentration an Ethanol detektiert werden. Diese erreicht nach 4 d ein Maximum von 10,0 g/L Ethanol und deutet somit auf eine unzureichende Sauerstoffversorgung der vorliegenden Biomasse hin.

Zusammenfassend konnte somit aufgrund des massiven Biomassewachstums an vorliegenden Reaktoreinbauten keine idealen Kultivierungsbedingungen im Reaktor erzielt werden, die eine effektive Produktion von Fumarsäure ermöglicht hätten. Ergänzend hierzu können mehrere Literaturquellen angeführt werden, die ebenfalls die hohe Tendenz von *Rhizopus* sp. beschreiben, sessil an Reaktoreinbauten zu wachsen. So zeigen beispielweise Darstellungen in Byrne et al. (1989) und auch Kosakei et al. (1997) heftig bewachsene Einbauten, mit vergleichbaren Auswirkungen auf das entsprechende Produktionssystem.

Um dem sessilen Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 an Reaktoreinbauten entgegenzuwirken, wurde eine weitere Reaktorkultivierung mit direkter Sporeninokulation durchgeführt. Hierbei wurde allerdings auf den Einsatz der pH- und pO₂-Elektrode verzichtet. Neben einer geringeren Oberfläche, die dem verwendeten Pilz zum Bewachsen zur Verfügung stand, konnte hierdurch auch ein verändertes Strömungsprofil bei gleichbleibender Rührerdrehzahl erzielt werden. Außerdem wurde während der Kultivierung zweimal (nach 3 d und 6 d) die Begasungsfritte unter sterilen Bedingungen ausgebaut und durch eine neue, gereinigte Fritte ersetzt. Dies verhinderte zwar nicht das prinzipielle Bewachsen, ermöglichte aber eine konstante Begasungsrate von 6,0 L/h (Luft) über den gesamten Kultivierungszeitraum. Unter Anwendung dieser Anpassungen ist der erzielte Kultivierungsverlauf in Abbildung 4.40 dargestellt.

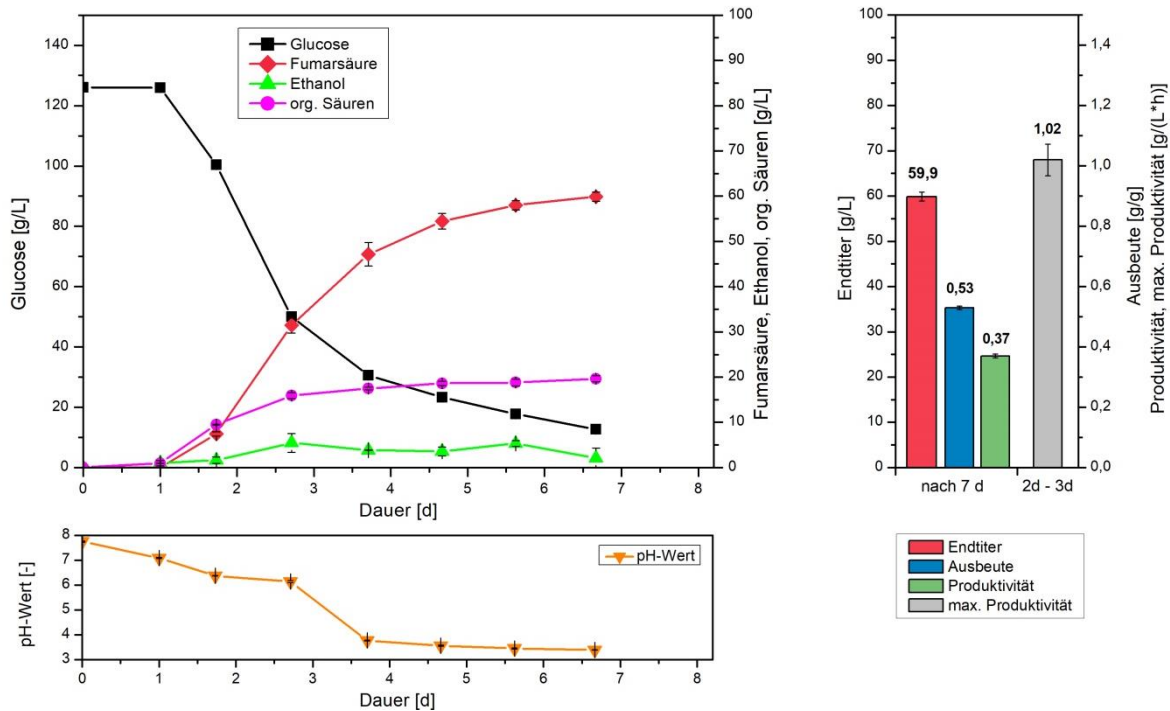


Abbildung 4.40: Reaktorkultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C bei 34 °C, 400 rpm, 6,0 L/h (Luft) und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) ohne weitere Zugabe von CaCO₃; 1 L-Reaktoren ohne pH- und pO₂-Elektroden, mit täglichem Wechsel der Begasungsfritte.

Durch die Reduktion an Reaktoreinbauten und dem zweimaligen Wechsel der Begasungsfritte konnte die allgemeine Reproduzierbarkeit der Kultivierung erhöht werden. Erkennbar ist dies anhand deutlich geringerer Standardabweichungen während der Kultivierung. Dabei konnte nach einer lag-Phase von 1 d und unter Ausbildung von Mycel-Morphologie eine einsetzende Akkumulation von Fumarsäure detektiert werden. Bis zum Aufbrauchen des vorgelegten Calciumcarbonats nach 4 d wurden 47,1 g/L Fumarsäure produziert. Anzumerken ist hierbei, dass zwischen dem zweiten und dritten Tag der Kultivierung eine sehr hohe Produktivität von 1,02 g/(L·h) festgestellt wurde. Im Vergleich zu Schüttelkolbenkultivierungen stellt dies eine deutliche Steigerung der maximalen Produktivität dar. Allerdings konnte ab diesem Zeitpunkt ein Rückgang der Verstoffwechslung von Glucose und der Produktion von Fumarsäure beobachtet werden. Als mögliche Ursache für diese Abnahme kann ein zu frühes Absinken des pH-Wertes angeführt werden, das negative Auswirkungen auf die Bildung von Fumarsäure hat (Roa Engel et al., 2011). Außerdem deutete der Verlauf der Konzentration an Ethanol auf eine zumindest punktuell nicht ideale Sauerstoffversorgung der Biomasse hin. So konnte nach 2 d bzw. 5 d eine ansteigende Konzentration an Ethanol festgestellt werden. Als Begründung kann dabei das Zuwachsen einzelner Poren der Begasungsfritte genannt werden. Dies ermöglichte zwar weiterhin einen konstante Begasungsrate von 6,0 L/h, führte aber gleichzeitig zur Ausbildung von großen Gasblasen, die eine geringere spezifische Phasengrenzfläche besaßen und somit nur einen reduzierten Sauerstoffübergang in die Flüssigphase ermöglichten. Durch das zweimalige Wechseln der Begasungsfritte wurde dieser Entwicklung erfolgreich entgegengewirkt. So konnte in anschließenden Probenahmen ein Rückgang der Konzentration an Ethanol festgestellt werden.

Insgesamt wurde bei dieser Kultivierung eine maximale Konzentration von 59,9 g/L Fumarsäure nach 7 d erzielt. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,53 g/g und einer Gesamtproduktivität von 0,37 g/(L·h).

Somit konnte durch das Weglassen der Elektroden und den zweimaligen Wechsel der Begasungsfritte die erzielte Endkonzentration an Fumarsäure um ca. 40 % gesteigert werden (vgl. Abbildung 4.38).

Weiter liefert ein Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit der entsprechenden Kultivierung im Schüttelkolben ein fast identisches Resultat (vgl. Kapitel 4.1.2.9). So konnte im Schüttelkolben bei direkter Sporeninokulation und ohne Zugabe weiteren Calciumcarbonats lediglich eine um 6 % höhere Ausbeute nach 7 d nachgewiesen werden. Bezogen auf die Produktivität wies die Schüttelkolbenkultivierung einen um lediglich 5 % höheren Wert auf. Somit verdeutlicht dieser Vergleich zunächst, dass auch unter Anwendung der für Schüttelkolbenkultivierungen getroffenen Prozessoptimierungen, eine vergleichbare Produktion von Fumarsäure in aktiv begasbaren 1 L-Reaktoren möglich ist. Zusätzlich deutet eine erstmals zwischen zwei Probenahmen erzielte maximale Produktivität von 1,02 g/(L·h) auf ein hohes Potenzial hin, eine schnellere Produktion von Fumarsäure zu realisieren. Als weiterhin problematisch stellte sich auch bei dieser Reaktorkultivierung das Bewachsen von Reaktoreinbauten dar, das durch bisherige Anpassungen zwar reduziert werden konnte, aber nicht vollständig unterbunden wurde.

Daher wurde der Einfluss einer vorgeschalteten Biomasseanzucht mittels Vorkultur auf die anschließende Reaktorkultivierung untersucht und im folgenden Kapitel beschrieben. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Zugabe von weiterem Calciumcarbonat betrachtet, der bereits bei Schüttelkolbenkultivierungen eine verbesserte Produktion an Fumarsäure ermöglichte.

4.1.6.2 Kultivierung mit Vorkultur im 1 L-Reaktor

Bei dem bisherigen Einsatz von Reaktoren zur Produktion von Fumarsäure erfolgte das Animpfen der Kultivierungen durch direkte Sporeninokulation. Dabei verhinderte das anschließende Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 an vorliegenden Reaktoreinbauten, wie z.B. der Begasungsfritte, eine ideale Prozessführung (s. Kapitel 4.1.6.2). Um dieses Problem zu lösen, wurde der Einfluss einer Vorkultur auf die Morphologie und das Produktionsverhalten der anschließenden Reaktorkultivierung untersucht.

Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur im Schüttelkolben und optimiertem Medium C mit Sporensuspension angeimpft und für 24 h bei 34 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 60 mL dieser Vorkultur zum Animpfen von 540 mL optimiertem Medium C im 1 L-Reaktor verwendet. Somit wurde analog zur entsprechenden Referenzkultivierung im Schüttelkolben auch bei diesem Ansatz ein Inokulationsverhältnis von 10 % (v/v) eingesetzt (vgl. Kapitel 4.1.4.1). Nach dem Animpfen erfolgte die Reaktorkultivierung bei 34 °C, einer konstanten Rührerdrehzahl von 400 rpm und einer Begasungsrate von 6,0 L/h (Luft). Außerdem wurde, um die Anzahl an Reaktoreinbauten möglichst gering zu halten, weiterhin auf den Einsatz einer pH- und pO₂-Elektrode verzichtet. Abweichend zu vorherigen Reaktorkultivierungen wurde bei diesem Ansatz neben einer initialen Konzentration an Calciumcarbonat von 50 g/L zusätzlich 20 g/L Calciumcarbonat nach 1 d hinzugegeben. Zudem wurde bei dieser Kultivierung kein Wechsel der Begasungsfritte vorgenommen. Der erzielte Kultivierungsverlauf mit der entsprechenden Morphologie ist in Abbildung 4.41 und Abbildung 4.42 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

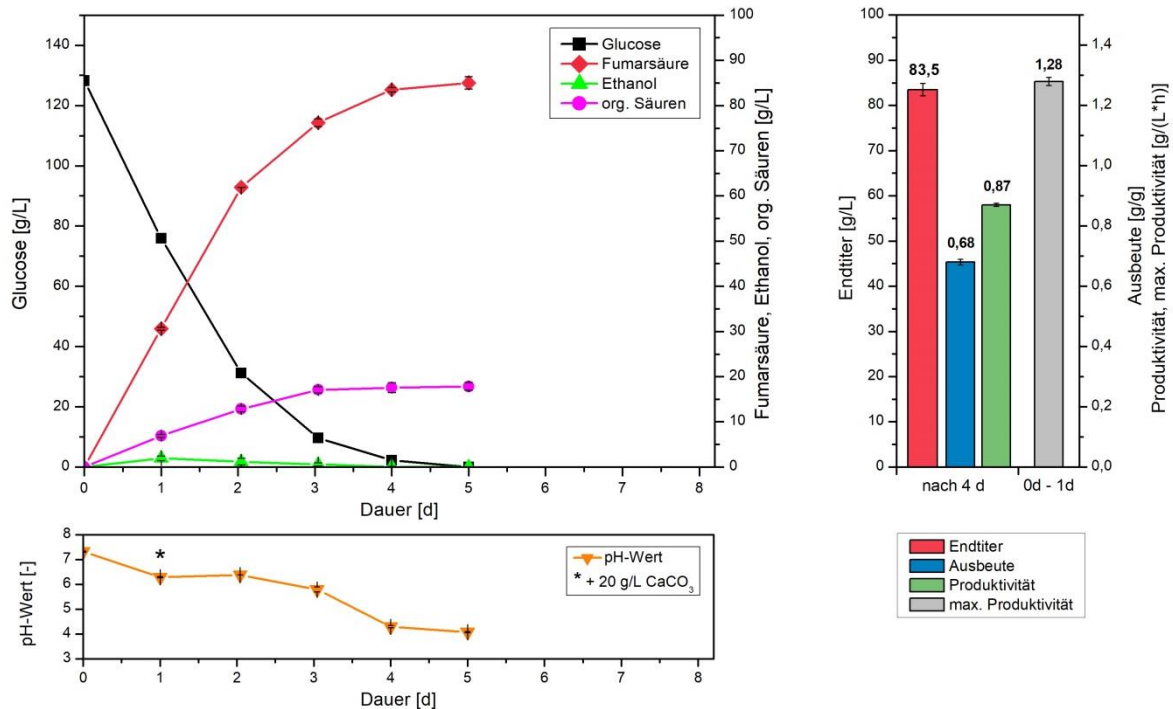


Abbildung 4.41: Reaktorkultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C bei 34 °C, 400 rpm, 6,0 L/h (Luft) und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR), mit Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 1 d; 1 L-Reaktoren ohne pH- und pO₂-Elektroden.

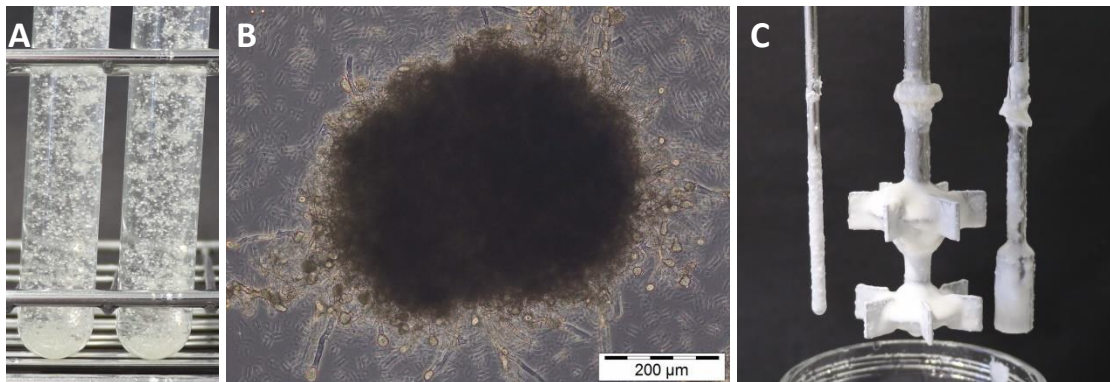


Abbildung 4.42: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Reaktorkultivierung mit Vorkultur und optimiertem Medium C; A - makroskopische Aufnahme der Pellet-Morphologie nach 3 d, B - mikroskopische Aufnahme eines Pellets nach 3 d, C - Aufnahme der Reaktoreinbauten nach 5 d.

Durch das Auskeimen der Sporen und die Ausbildung von einzelnen Mycelflocken in der vorgeschalteten Vorkultur konnte bei der anschließenden Reaktorkultivierung innerhalb der ersten 24 h keine lag-Phase festgestellt werden. So zeigte der Kultivierungsverlauf in diesem Bereich bereits eine starke Abnahme der Glucosekonzentration unter Bildung von 30,6 g/L Fumarsäure auf. Dies entspricht einer sehr hohen Produktivität von 1,28 g/(L·h) innerhalb des ersten Tages. Auch bei dem darauf folgenden Tag konnte ein fast linearer Zuwachs der Konzentration an Fumarsäure festgestellt werden. Somit betrug die Produktivität nach 2 d noch 1,26 g/(L·h). Ab diesem Zeitpunkt wurde mit einsetzender Glucoselimitierung ein Rückgang der Verstoffwechslung von Glucose und eine zunehmend geringerer Anstieg an Fumarsäure beobachtet. Mit 83,5 g/L Fumarsäure erreichte das Kultivierungssystem nach einer Dauer von 4 d einen Endtiter, der einer Ausbeute von 0,68 g/g und einer Gesamtproduktivität von 0,87 g/(L·h) entsprach.

Ein Vergleich dieses Ergebnisses mit der entsprechenden Kultivierung im Schüttelkolbensystem zeigt zunächst auf, dass vergleichbare Ergebnisse bezogen auf die Endkonzentration an Fumarsäure (86,3 g/L) und die Ausbeute (0,67 g/g) erzielt wurden (vgl. Kapitel 4.1.4.5). Auch die Konzentration der anderen organischen Säuren, die zum Ende der jeweiligen Kultivierung vorlagen, zeigten keine signifikanten Unterschiede auf. Im Gegensatz zu diesen Übereinstimmungen konnte allerdings bezogen auf die Gesamtproduktivität ein großer Unterschied festgestellt werden. So wurde bei der Reaktorkultivierung eine um 45 % gesteigerte Gesamtproduktivität detektiert. Dies resultierte in einer Verkürzung der Kultivierungsdauer von zwei Tagen, die notwendig waren, um die initiale Glucosekonzentration von 130 g/L zu verstoffwechseln.

Als Grund für die deutlich gesteigerte Produktivität kann die erzielte Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 angeführt werden. So lag die gebildete Biomasse nicht wie bisher in Form von losem Mycelium vor, sondern zeigte die Ausbildung von einzelnen, kleinen Pellets auf (s. Abbildung 4.42, A). Um diese Art der Morphologie genauer zu beschreiben, ist in Abbildung 4.42, B ein Pellet nach einer Kultivierungsdauer von 3 d exemplarisch dargestellt. Neben einem hohen Grad an gebundenem Calciumcarbonat wiesen die Pellets eine Größe von ca. 500 µm auf, die nach Zhou et al. (2011) ideal für die Produktion von Fumarsäure sind. Bezogen auf das Bewachsen von Reaktoreinbauten konnte bei dieser Kultivierung nur eine minimale Anlagerung von Biomasse am Rührer festgestellt werden. Die Begasungsfritte zeigte dagegen selbst nach einer Dauer von 5 d kein Wachstum von sessiler Biomasse auf (s. Abbildung 4.42, C). Somit konnte der Kultivierungsansatz über den gesamten Zeitraum mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden, ohne einen Wechsel der Begasungsfritte vornehmen zu müssen. Die im Vergleich zu vorherigen Reaktorkultivierungen verbesserte Sauerstoffversorgung spiegelte sich auch in der Menge an gebildetem Ethanol wider. So konnte bei der hier durchgeführten Reaktorkultivierung nur ein minimaler Anstieg der Ethanolkonzentration auf 1,9 g/L nach 1 d detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung war die Konzentration an Ethanol rückläufig und konnte nach 4 d nicht mehr nachgewiesen werden.

Bezogen auf die Regulierung des pH-Wertes konnte bei der hier angewendeten Kultivierungsstrategie (50 g/L Calciumcarbonat, mit Zugabe von 20 g/L nach 1 d) ein vorzeitiges Absinken des pH-Wertes erfolgreich verhindert werden. So konnte erst nach der Produktion von > 70 g/L Fumarsäure und einer Kultivierungsdauer von 3 d der vollständige Verbrauch des Calciumcarbonats festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte das für Schüttelkolben optimierte Kultivierungssystem mit Vorkultur erfolgreich in 1 L-Reaktoren übertragen werden. Dabei zeigte die vorliegende Biomasse eine einheitliche Pellet-Morphologie auf, die nur sehr geringe Tendenzen aufwies Reaktoreinbauten zu bewachsen. Bezogen auf die Produktionseigenschaften dieser Morphologie wurde hinsichtlich der Ausbeute, im Vergleich zu Schüttelkolbenkultivierungen, ein identisches Produktionsverhalten nachgewiesen. Allerdings ermöglichten das aktive Begasen des Kultivierungsansatzes und die dadurch verbesserte Sauerstoffversorgung einen deutlichen Anstieg der Produktivität. So konnte bei der Kultivierung im 1 L-Reaktor mit 0,87 g/(L·h) die höchste Gesamtproduktivität der gesamten Arbeit erzielt werden. Dabei stellte vor allem die sehr hohe Produktivität von 1,26 g/(L·h) während den ersten beiden Tagen einen vielversprechenden Ansatz dar, um die allgemeine Effizienz des Produktionssystems zu verbessern. In diesem Zusammenhang kann außerdem angeführt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Optimierung der Begasungsrate vorgenommen wurde. So wurde unter

Berücksichtigung des Kultivierungsvolumens eine konstante Belüftungsrate von 0,17 vvm verwendet. Ein Vergleich dieses Wertes mit Literaturangaben zeigt auf, dass bei der fermentativen Produktion von Fumarsäure durchaus höhere Belüftungsraten von 0,5 - 2,0 vvm eingesetzt werden (Ling und Ng, 1989; Cao et al., 1996; Kang et al., 2010). Es ist daher zu erwarten, dass eine Erhöhung der Begasungsrate potenziell die Effektivität der Reaktorkultivierung weiter verbessern kann.

4.1.7 Referenzkultivierung mit separater Produktion von Biomasse

Bei den beiden bisher untersuchten Kultivierungsstrategien erfolgte die Produktion von Fumarsäure in einem Medium, das dem verwendeten Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 auch den Aufbau von Biomasse ermöglichte. Da bei dieser wachstumsgekoppelten Produktion von Fumarsäure auch Glucose für das Biomassewachstum verbraucht wird, ist bei dieser Prozessführung mit prinzipiell geringeren Ausbeuten an Fumarsäure zu rechnen. In diesem Zusammenhang konnte bereits Riscaldati et al. (2000) aufzeigen, dass niedrigere Konzentrationen an Phosphat in der Ausbildung von weniger Biomasse resultieren und dies einen positiven Einfluss auf die Ausbeute hat. Ergänzend hierzu konnte auch in Ding et al. (2011) eine gesteigerte Ausbeute an Fumarsäure beim Vorliegen von geringeren Konzentrationen an Biomasse nachgewiesen werden. Als wachstumslimitierender Faktor wurde innerhalb dieser Publikation die Konzentration an Harnstoff reduziert, der als einzige Stickstoffquelle diente. Dass prinzipiell auch eine Produktion von Fumarsäure unter vollständig wachstums-limitierenden Bedingungen möglich ist, konnte in Roa Engel et al. (2011) aufgezeigt werden. Hierbei wurde zunächst mit einer Vorkultur Biomasse angezogen. Diese wurde anschließend vom Wachstumsmedium befreit und mit frischem Produktionsmedium kultiviert, das keine Stickstoffquelle enthielt.

Basierend auf der Prozessstrategie von Roa Engel et al. (2011) wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die Produktion von Fumarsäure unter vollständig wachstumslimitierenden Bedingungen in Schüttelkolben untersucht. Hierzu wurde zunächst eine zweistufige Vorkultur durchgeführt, um ausreichend Biomasse aufzubauen. Als Prozessvorlage diente hierbei die in Kapitel 4.1.4 beschriebene Referenzkultivierung mit Vorkultur. Dabei wurde nach der ersten Vorkultur (über 24 h) die anschließende Hauptkultur als zweite Vorkultur verwendet und nach einer Kultivierungsdauer von 2 d abgebrochen. Die bis dahin gebildete Biomasse wurde mehrmals gewaschen, eingengt und zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Durch das Weglassen von Ammonium im Medium der Hauptkultur stand der so eingesetzten Biomasse keine Stickstoffquelle mehr zur Verfügung, die ein weiteres Wachstum ermöglichen könnte.

Zur Überprüfung dieser Aussage wurde im Folgenden zunächst die zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten vorliegende Biomasse quantifiziert. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde anschließend die Produktion von Fumarsäure bei dem hier verwendeten Kultivierungssystem genauer beschrieben.

4.1.7.1 Bestimmung der Biomassekonzentration während der Kultivierung

Wie zuvor beschrieben, erfolgte die Ausbildung von Biomasse innerhalb dieser Kultivierungsstrategie zunächst mit einer zweistufigen Vorkultur. Nach dem Transfer der Biomasse in die Hauptkultur ist der erzielte Verlauf der Konzentration an Biotrockenmasse in Abbildung 4.43 dargestellt. Zusätzlich enthält diese Abbildung den Verlauf der Glucosekonzentration während der Hauptkultur und die dabei detektierten Konzentrationen an Ammonium und Phosphat.

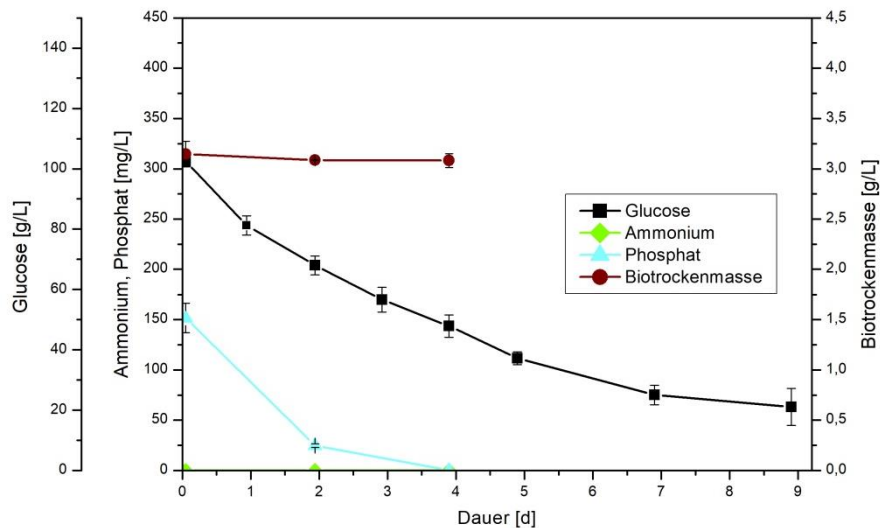


Abbildung 4.43: Verlauf der Konzentrationen von Biotrockenmasse, Ammonium und Phosphat bei der Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit zweistufiger Vorkultur und optimiertem Medium C (ohne Ammonium) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2 und 4 d.

In Bezug auf Glucose konnte zu Beginn der Hauptkultur nur eine Startkonzentration von ca. 100 g/L festgestellt werden. Als Begründung kann hierbei das Animpfen mit der eingengter Biomasse angeführt werden, die bei Zugabe ins Hauptkulturmedium (130 g/L initiale Glucose) den Kultivierungsansatz verdünnt. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurde anschließend ein Rückgang der Glucosekonzentration detektiert, der allerdings keine vollständige Verstoffwechslung innerhalb von 9 d ermöglichte. Bezogen auf die vorliegende Konzentration an Phosphat von ca. 150 mg/L konnte innerhalb von 4 d ein vollständiges Aufbrauchen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wurde zu Beginn und auch während der Kultivierung kein Ammonium im Kultivierungsansatz nachgewiesen. Diese Beobachtung bestätigt somit das Vorliegen von wachstumslimitierenden Bedingungen. Durch die separate Anzucht der Biomasse in einer zweistufigen Vorkultur konnte zu Beginn der Hauptkultur eine initiale Konzentration der Biotrockenmasse von 3,15 g/L eingesetzt werden. Dabei zeigten weitere Untersuchungen nach 2 d bzw. 4 d, dass während der Hauptkultur keine weitere Biomasse gebildet wurde. Vielmehr konnte nach einer Kultivierungsdauer von 4 d ein minimaler Rückgang der Biomassekonzentration auf 3,08 g/L Biotrockenmasse festgestellt werden. Aufgrund dieses fast konstanten Verlaufs kann somit belegt werden, dass durch den Verzicht von Ammonium im Hauptkulturmedium ein weiteres Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 erfolgreich unterbunden werden konnte. Folglich erfolgte die im nächsten Kapitel beschriebene Produktion von Fumarsäure vollständig wachstumsentkoppelt.

4.1.7.2 Produktion von Fumarsäure unter wachstumslimitierenden Bedingungen

Ergänzend zum zuvor beschriebenen Verlauf der Biomassekonzentration, wurde während dieser Kultivierung ebenfalls die Konzentration von Fumarsäure und weiterer Prozessparameter analysiert und in Abbildung 4.44 graphisch dargestellt.

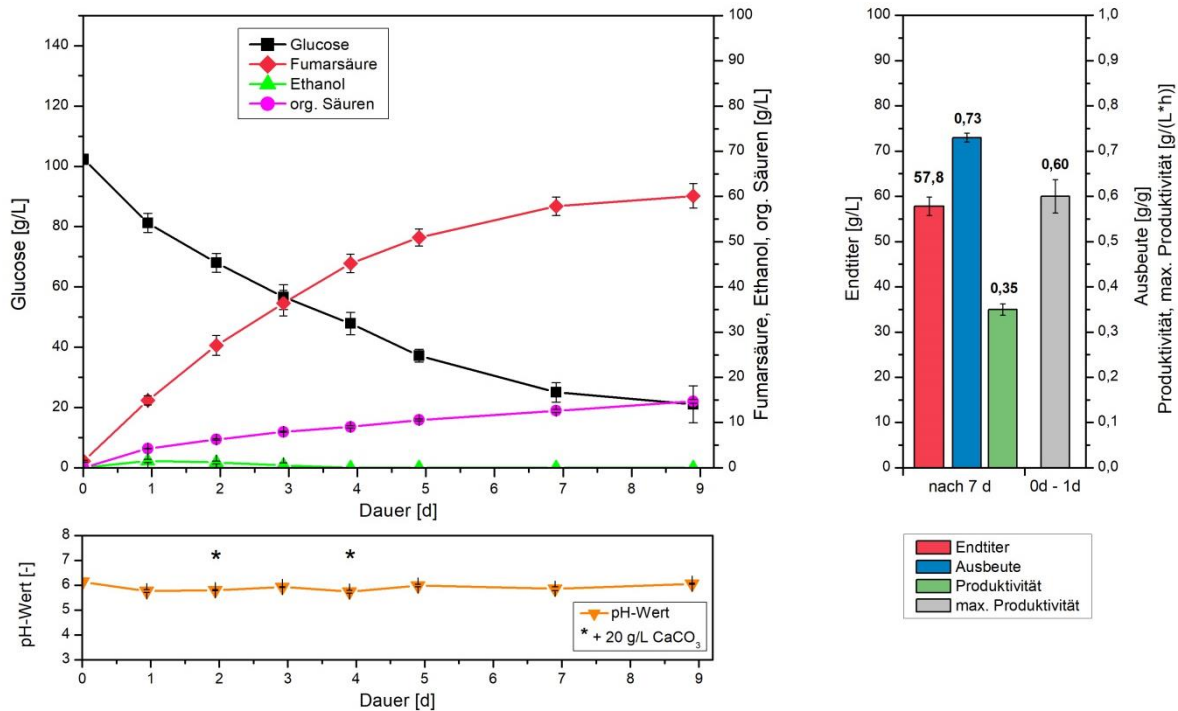


Abbildung 4.44: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit zweistufiger Vorkultur und optimiertem Medium C (ohne Ammonium) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO₃ nach 2 und 4 d.

Anhand des Kultivierungsverlaufs wird ersichtlich, dass eine wachstumsentkoppelte Produktion von Fumarsäure prinzipiell möglich war. So konnte über den gesamten Kultivierungszeitraum von 9 d eine Zunahme der Konzentration an Fumarsäure nachgewiesen werden. Allerdings deutete sowohl ein Rückgang der Verstoffwechslung von Glucose als auch eine geringere Produktivität an Fumarsäure auf eine Abnahme der Produktionsfähigkeit mit fortschreitender Kultivierungsdauer hin. Dabei konnte ein Absinken des pH-Werts während der Kultivierung als mögliche Ursache ausgeschlossen werden. Auch in der ausgebildeten Mycel-Morphologie, die über den gesamten Kultivierungsverlauf gleichbleibend vorlag, konnte keine Ursache für die abnehmende Produktion an Fumarsäure ausgemacht werden. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die vorliegende Biomasse nur eine minimale Tendenz aufwies, Ethanol zu bilden. So wurde mit lediglich 1,5 g/L eine maximale Konzentration dieses Nebenproduktes nach 1 d nachgewiesen. Im Vergleich zu bisherigen Schüttelkolbenkultivierungen stellte dies eine deutliche Verbesserung dar (vgl. Kapitel 4.1.3 und Kapitel 4.1.4). Somit konnte bei einer Schüttelkolbenkultivierung unter wachstumslimitierenden Bedingungen über den gesamten Kultivierungszeitraum eine ausreichende Sauerstoffversorgung der vorliegenden Biomasse gewährleistet werden.

Insgesamt wurde bei der Kultivierung unter wachstumslimitierenden Bedingungen innerhalb von 7 d eine Konzentration von 57,8 g/L Fumarsäure erzielt. Dies entspricht unter nicht vollständiger Verstoffwechslung der initialen Glucose einer Ausbeute von 0,73 g/g und einer Produktivität von

0,35 g/(L·h). Um dieses Ergebnis in den Kontext bisheriger Kultivierungen einzuordnen, kann ein Vergleich mit einer wachstumsgekoppelten Schüttelkolbenkultivierung angeführt werden, bei der ebenfalls durch Zugabe von Calciumcarbonat der pH-Wert über den gesamten Kultivierungszeitraum reguliert wurde (s. Kapitel 4.1.4.1). Bei diesem Vergleich zeigt sich zunächst, dass bei einer Kultivierung unter wachstumslimitierenden Bedingungen eine um ca. 40 % geringere Gesamtproduktivität erzielt wird. Dagegen ermöglichte die hier untersuchte Kultivierungsstrategie eine Steigerung der Ausbeute um ca. 16 %. Hervorzuheben ist dabei, dass es sich bei der hier erzielten Ausbeute von 0,73 g/g um die höchste Ausbeute handelt, die in dieser Arbeit auf Basis von Glucose erzielt werden konnte.

Zusammenfassend wurde somit eine vielversprechende Kultivierungsstrategie beschrieben, die zunächst eine separate Anzucht der Biomasse beinhaltet und anschließend eine vollständig wachstumsentkoppelte Produktion von Fumarsäure ermöglicht.

4.1.8 Zusammenfassung und Vergleich mit der Literatur

Unter Verwendung der Kohlenstoff- und Energiequelle Glucose wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Einfluss von verschiedenen Kultivierungsparametern auf die fermentative Produktion von Fumarsäure untersucht. Hierbei wurde ein Kultivierungssystem mit *R. arrhizus* NRRL 1526 und Schüttelkolben verwendet, das auf der Batch-Kultivierung von Ling und Ng (1989) beruht. Abweichend zu dieser Kultivierungsstrategie konnte, durch den Verzicht einer Vorkultur und die direkte Inokulation des Hauptkulturmediums mit Sporensuspension, das Kultivierungssystem vereinfacht werden. Dies ermöglichte eine systematische und effektive Untersuchung einzelner Prozessparameter und lieferte somit vielversprechende Ansätze um das vorliegende Produktionssystem zu verbessern. So konnte beispielsweise durch das Weglassen von Komplexmedienbestandteilen ein definiertes Minimalmedium eingesetzt werden, das die allgemeinen Produktionseigenschaften erhöhte. Außerdem konnte durch den Einsatz verschiedener Partikelgrößen an Calciumcarbonat der Zusammenhang zwischen auftretender Morphologie und Produktion von Fumarsäure genauer untersucht werden. Dabei zeigte das Vorliegen von einzelnen Mycelflocken die besten Produktions-eigenschaften unter Anwendung der bis hierhin optimierten Kultivierungsbedingungen.

Aufgrund des Auftretens einer lag-Phase bei der Referenzkultivierung mit direkter Sporeninokulation, die sich negativ auf die Gesamtproduktivität der Kultivierung auswirkt, wurde im Folgenden der Einsatz einer Vorkultur untersucht. Hierbei konnte das Auskeimen der Sporen und die Ausbildung von Biomasse erfolgreich in ein Kultivierungsvolumen von 10 % (v/v) ausgelagert werden. Dies resultierte in einer Steigerung der allgemeinen Produktionseigenschaften. Außerdem lieferte die Kultivierungsstrategie mit Vorkultur ein stabiles und robustes Kultivierungssystem, das ein Upscaling in ein Reaktorsystem zuließ. Hierbei konnte unter Einsatz einer aktiven Begasung und Ausbildung von Pellet-Morphologie eine maximale Produktivität von 1,28 g/(L·h) innerhalb der ersten 24 h und eine Gesamtproduktivität von 0,87 g/(L·h) nach 4 d festgestellt werden. Im Vergleich zur entsprechenden Schüttelkolbenkultivierung entspricht dies einer Steigerung um 45 %. Neben dem hohen Potenzial eines Upscalings konnte in Schüttelkolben außerdem eine Verlängerung der Produktionsphase erreicht werden. Hierzu wurde eine Kultivierungsstrategie entwickelt, die unter Zugabe von zusätzlicher Glucose und Ammonium eine Produktion von Fumarsäure über 11 d bzw. 15 d ermöglichte. Dabei konnten mit 158,5 g/L und 195,4 g/L die höchsten Endkonzentrationen an Fumarsäure in dieser Arbeit detektiert werden.

Sowohl bei der Referenzkultivierung mit direkter Sporeninokulation als auch bei der Kultivierung mit Vorkultur findet die Produktion an Fumarsäure parallel zum Biomassewachstum statt. Es handelt sich somit um ein wachstums-assoziiertes Produktionsverhalten. Um ergänzend hierzu auch eine wachstumsentkoppelte Produktion von Fumarsäure zu untersuchen, wurde eine weitere Kultivierungsstrategie entwickelt. Diese ermöglichte unter Einsatz einer zweistufigen Vorkultur zunächst das Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526. Die eigentliche Produktion von Fumarsäure erfolgte anschließend in einer separaten Kultivierung, bei der aufgrund eines Verzichts von Ammonium im Medium kein weiteres Biomassewachstum möglich war. Unter Anwendung dieser Prozessstrategie konnte erfolgreich vollständig wachstumsentkoppelt Fumarsäure produziert werden. Dabei wurde auf Basis von Glucose im Vergleich zu bisherigen Kultivierungen mit 0,73 g/g die höchste Ausbeute innerhalb dieser Arbeit erzielt.

Zur besseren Veranschaulichung der bisher durchgeführten Kultivierungsansätze und um eine Vergleichbarkeit mit Literaturangaben zu erleichtern, sind in Tabelle 4.4 die erzielten Kultivierungsergebnisse vergleichend dargestellt.

Tabelle 4.4: Vergleich der Kultivierungsergebnisse zur Produktion von Fumarsäure auf Basis von Glucose mit *R. arrhizus* NRRL 1526.

Kultivierung mit	System	Dauer [d]	Endtiter [g/L]	Ausbeute [g/g]	Produktivität [g/(L·h)]
Bedingungen nach Ling und Ng (1989)	SK	6	29,5	0,26	0,21
Direkte Sporeninokulation	SK	7	71,7	0,58	0,44
Vorkultur	SK	6	86,3	0,67	0,60
	STR	4	83,5	0,68	0,87
Zugabe von Glucose und Ammonium	SK	11	158,5	0,57	0,60
	SK	15	195,4	0,54	0,54
Separate Produktion von Biomasse	SK	7	57,8	0,73	0,35

SK - Schüttelkolben, STR - Rührreaktor

Anhand der vergleichenden Darstellung wird ersichtlich, dass bei den hier untersuchten Kultivierungsstrategien kein alleinstehendes Kultivierungssystem heraussticht, das gegenüber anderen Strategien in allen Produktionseigenschaften überlegen ist. Vielmehr weisen die verschiedenen Referenzkultivierungen im Hinblick auf eine möglichst effektive Produktion von Fumarsäure spezifische Vor- und Nachteile auf. Daher werden im Folgenden hervorzuhebende Kultivierungsergebnisse anhand ausgewählter Literaturangaben vergleichend diskutiert.

Bezogen auf die erzielte Endkonzentration an Fumarsäure konnte unter Einsatz einer Vorkultur im Schüttelkolben ein Endtiter von 86,3 g/L Fumarsäure erzielt werden. Hierzu wurde in der Hauptkultur eine initiale Glucosekonzentration von 130 g/L verwendet. Ein Vergleich dieses Endtiters mit der Literatur zeigt einen interessanten Sachverhalt auf. So konnte zwar unter Einsatz von vergleichbaren Kultivierungsbedingungen bereits in mehreren Publikationen die Produktion von ca. 100 g/L Fumarsäure beschrieben werden (Rhodes et al., 1959; Rhodes et al., 1962; Kenealy et al., 1986). Mit 135,3 g/L ist in diesem Zusammenhang das Patent von Ling und Ng (1989) besonders hervorzuheben, da es sich hierbei um die aktuell höchste fermentativ hergestellte Endkonzentration an Fumarsäure handelt. Allerdings liegen diese Publikationen bereits mindestens dreißig Jahre zurück und die dort erzielte Endkonzentration konnten seitdem nicht mehr reproduziert werden (Roa Engel et al., 2008). Somit handelt es sich bei dem in dieser Arbeit erzielten Endtiter um die höchste Konzentration an Fumarsäure, die seit dreißig Jahren mittels einer Batch-Kultivierung hergestellt werden konnte. Ergänzend hierzu konnte unter Zugabe von Glucose und Ammonium eine weitere Steigerung der Endkonzentration erzielt werden. Bei der dafür angewendeten Kultivierungsstrategie handelt es sich um einen Ansatz, der bei der Produktion von Fumarsäure bisher nur wenig untersucht wurde. So konnte mit Riscaldati et al. (2002) nur eine einzige Publikation gefunden werden, bei der durch Zugabe von Glucose eine Verlängerung der Produktionsphase untersucht wurde. Hierbei wurde eine Endkonzentration von 64 g/L Fumarsäure erreicht. Im Gegensatz zu diesem Endtiter konnte in dieser Arbeit ein deutlicher

Anstieg der Endkonzentration auf bis zu 195,4 g/L Fumarsäure festgestellt werden. Es handelt sich bei diesen Werten um die mit Abstand höchsten Konzentrationen an Fumarsäure, die nach aktuellem Wissensstand biotechnologisch hergestellt werden konnten (Xu et al., 2012; Ilica et al., 2018).

Da die maximal mögliche Endkonzentration an Fumarsäure direkt von der Menge an eingesetzter Glucose abhängt, stellt die Ausbeute einen interessanten Produktionsparameter dar, um verschiedene Kultivierungsergebnisse miteinander vergleichen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Einsatz der Vorkulturstrategie eine Ausbeute von 0,67 g/g in Schüttelkolben bzw. 0,68 g/g in Reaktoren erzielt werden. Dagegen lieferte eine Trennung des Biomassewachstums von der eigentlichen Produktion von Fumarsäure eine gesteigerte Ausbeute von 0,73 g/g. Somit konnte anhand einer vollständig wachstumsentkoppelten Fumarsäureproduktion die höchste Ausbeute auf Basis von Glucose erzielt werden. Eine Einordnung dieses Wertes in die Literatur zeigt, dass es sich bei diesem Ergebnis um eine durchaus typische Ausbeute handelt. So konnten zahlreiche Publikationen gefunden werden, die bei der fermentativen Produktion von Fumarsäure Ausbeuten im Bereich von 0,65 g/g - 0,75 g/g aufweisen (Gangle et al., 1990; Huang et al., 2010; Zhang et al., 2015; Papadaki et al., 2017). Neben deutlich geringeren Ausbeuten konnten allerdings auch einige Literaturquellen gefunden werden, die Ausbeuten > 0,75 g/g erzielten. So konnte beispielsweise in Kenealy et al. (1986) eine Kultivierung mit einer Ausbeute von 0,81 g/g durchgeführt werden. Auch in Das et al. (2016b) wird eine Kultivierungsprozess beschrieben, der eine hohe Ausbeute von 0,84 g/g aufwies. Neben einem sehr hohen Endtiter an Fumarsäure wird in dem Patent von Ling und Ng (1989) ebenfalls eine sehr hohe Ausbeute von 1,04 g/g beschrieben. Anzumerken ist hierbei, dass unter Berücksichtigung aller gebildeten organischen Säuren und der dafür verstoffwechselten Menge an Glucose, eine Ausbeute von $1,997 \text{ mol}_{\text{org. Säuren}}/\text{mol}_{\text{Glu}}$ erzielt wurde. Unter Voraussetzung einer ausschließlich reduktiv ablaufenden Synthese, die eine maximale theoretische Ausbeute von 2,0 mol/mol ermöglicht, deutet dieses Ergebnis somit auf eine unrealistisch effektive Prozessführung zur Produktion von organischen Säuren hin (Ling und Ng, 1989).

Unter Berücksichtigung der notwendigen Kultivierungsdauer ermöglicht die Produktivität weitere Aussagen über die Effizienz der jeweiligen Kultivierung. In diesem Zusammenhang konnte bei den in Tabelle 4.4 dargestellten Kultivierungen eine maximale Gesamtproduktivität von 0,87 g/(L·h) festgestellt werden. Die entsprechende Kultivierung erfolgte in 1 L-Reaktoren, die gegenüber Schüttelkolben eine gesteigerte Produktivität ermöglichten. Eine Einordnung dieses Ergebnisses in die Literatur zeigt auf, dass bereits Kultivierungen mit deutlich höheren Produktivitäten erzielt wurden. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang vor allem ein Kultivierungsansatz von Cao et al. (1997), bei dem mittels immobilisierter Biomasse auf Kunststoffscheiben in einem rotierenden Biofilm Contactor eine Produktivität von 3,78 g/(L·h) erreicht wurde. Durch eine kontinuierliche Abtrennung von gebildeter Fumarsäure konnte diese sogar auf 4,25 g/(L·h) erhöht werden (Cao et al., 1996). Im Gegensatz hierzu konnten mit nicht immobilisierter Biomasse deutlich geringere Gesamtproduktivitäten erzielt werden. Dabei weist die Reaktorkultivierung von Ling und Ng (1989) mit 1,77 g/(L·h) die höchste Produktivität auf, die mit einem aktiv begasten Kultivierungssystem erreicht wurde. Bezogen auf eine Produktion von Fumarsäure in Schüttelkolbensystemen wurde in Das et al. (2015b) eine Gesamtproduktivität von 1,37 g/(L·h) festgestellt. Es handelt sich hierbei um die höchste Produktivität, die in Schüttelkolben erzielt werden konnte.

Zusammenfassend zeigt ein Vergleich der hier untersuchten Literatur, dass bereits eine Vielzahl von unterschiedlichen Kultivierungssystemen und Prozessstrategien untersucht wurden. Dabei wurden allerdings aufgrund eines komplexen Zusammenspiels von verwendeten Kultivierungsbedingungen, auftretender Morphologie und den daraus resultierenden Produktionseigenschaften deutlich unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Dieser Sachverhalt verhindert außerdem eine direkte Reproduktion von bereits publizierten Kultivierungsstrategien. So können beispielsweise die sehr erfolgreichen Kultivierungsergebnisse von Ling und Ng (1989) in aktueller Literatur nicht mehr erzielt werden. In diesem Kontext stellen die Ergebnisse dieser Arbeit einen wichtigen Beitrag dar, um das allgemeine Verständnis bei der fermentativen Produktion von Fumarsäure zu verbessern und somit ein effektives und stabiles Produktionssystem zu entwickeln.

4.2 Produktion von Fumarsäure auf Basis von alternativen Zuckern

Unter Einsatz der Kohlenstoff- und Energiequelle Glucose konnten insgesamt drei unterschiedliche Referenzkultivierungen zur Fumarsäureproduktion entwickelt werden (Kultivierung mit direkter Sporeninokulation, Kultivierung mit Vorkultur und Kultivierung mit separater Biomasseproduktion). Hinsichtlich einer später diskutierten Verwendung von agrarischen Reststoffen ist neben Glucose auch das Kultivierungspotenzial von alternativen Monosacchariden von großem Interesse. So weisen beispielsweise agrarische Reststoffe, die bei der Verarbeitung von Früchten anfallen, neben Glucose auch hohe Anteile an Fructose auf (Vendruscolo et al., 2008). Dagegen enthält lignocellulosehaltige Biomasse große Mengen an Xylose (Ji et al., 2012). Um den prinzipiellen Einsatz dieser beiden Typen an agrarischen Reststoff zu untersuchen, wurde im Folgenden zunächst das Monosaccharid Glucose durch Fructose bzw. Xylose substituiert und der Einfluss auf das Kultivierungsverhalten untersucht. Ergänzend hierzu wurde ebenfalls der Einfluss einer Zuckermischung untersucht, die dem Verhältnis an Monosacchariden des entsprechenden nachwachsenden Reststoffs entsprach.

4.2.1 Kultivierung mit direkter Sporeninokulation

Um den Einsatz eines alternativen Monosaccharids bei direkter Sporeninokulation zu untersuchen, wurde analog zur Referenzkultivierung mit Glucose (s. Kapitel 4.1.3) eine Kultivierung mit Fructose durchgeführt. Als Zuckerquelle stand dem verwendeten Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 eine Konzentration von 130 g/L Fructose zur Verfügung. Der dabei erzielte Kultivierungsverlauf mit der entsprechenden Morphologie ist in Abbildung 4.45 dargestellt.

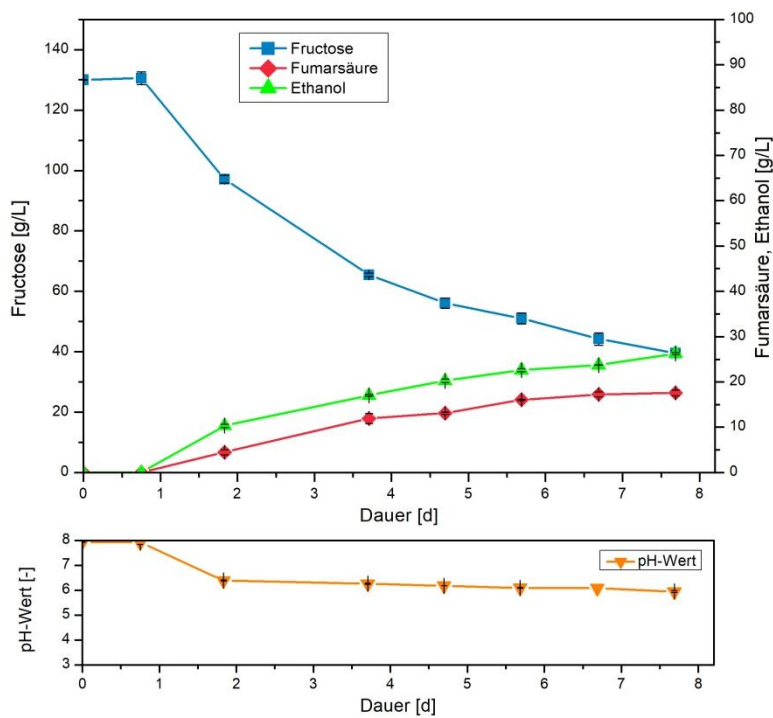


Abbildung 4.45: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C (mit 130 g/L Fructose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); Aufnahme der Morphologie nach 7 d.

Hierbei ist prinzipiell zu beachten, dass bei Präsenz von Fructose im Kultivierungsansatz keine analytische Bestimmung der anderen organischen Säuren (Äpfelsäure und Bernsteinsäure) möglich war. Begründet ist dies durch eine Überlagerung der entsprechenden HPLC-Signale, die eine separate Quantifizierung der einzelnen Komponenten verhinderte. Neben Fructose zeigten auch andere Monosaccharide (außer Glucose) dieses Verhalten auf. Somit konnte die Konzentration an anderen organischen Säuren nur nach einer vollständigen Verstoffwechslung der entsprechenden Monosaccharide bestimmt werden. Da die Quantifizierung von Fructose und anderen Monosacchariden

mittels HPAEC-PAD-Analyse erfolgte, wurden die entsprechenden Zucker-konzentrationen über den gesamten Kultivierungsverlauf erfasst.

Bei der Kultivierung mit Fructose und direkter Sporeninokulation konnte nach einer lag-Phase von 1 d das Einsetzen der Verstoffwechslung von Fructose beobachtet werden. Allerdings ermöglichte dieser Kultivierungsansatz keinen Vollumsatz innerhalb des untersuchten Kultivierungszeitraums. Bezogen auf die Produktion von Fumarsäure konnte nur eine geringe Zunahme detektiert werden, die nach 8 d einen Endtiter von 17,6 g/L erreichte. Dabei wurde neben Fumarsäure auch ein kontinuierlicher Anstieg von Ethanol beobachtet, der auf eine unzureichende Sauerstoffversorgung der vorliegenden Biomasse hindeutete. Als Ursache für diese Feststellung kann die auftretende Morphologie angeführt werden, die nach 7 d kompakte Klumpen mit eingelagertem Calciumcarbonat aufzeigte. Somit konnte, im Gegensatz zur entsprechenden Kultivierung mit Glucose (s. Kapitel 4.1.3), keine für die Produktion von Fumarsäure geeignete Wachstumsform erzielt werden. Trotz der prinzipiellen Fähigkeit auch Fructose zu verstoffwechseln, war somit eine direkte Übertragung dieser Kultivierungsstrategie auf das Monosaccharid Fructose nicht möglich.

4.2.2 Kultivierung mit Vorkultur

Um das zuvor beschriebene Auftreten von Klumpen-Morphologie bei Verwendung des Monosaccharids Fructose zu verhindern, wurde im Rahmen dieses Kapitels zunächst über 24 h Biomasse mit einer Vorkultur angezogen. Analog zu Kapitel 4.1.4 wurde hierfür das optimierte Medium C und Glucose als Zuckerquelle eingesetzt. Der Einsatz von Glucose ermöglicht dabei die Ausbildung von einzelnen Mycelflocken innerhalb der Vorkultur. Durch das anschließende Animpfen der Hauptkultur, die optimiertes Medium C mit einem anderen Monosaccharid enthielt, konnte die Produktion von Fumarsäure auf Basis alternativer Zucker untersucht werden. Anzumerken ist hierbei, dass beim Animpfen mit einem Inokulationsverhältnis von 10 % (v/v) neben Biomasse auch Vorkulturmedium in die Hauptkultur übertragen wurde. Daher wiesen Hauptkulturen, die mit dieser Kultivierungsstrategie durchgeführt wurden, zu Beginn geringe Konzentrationen an Glucose auf.

4.2.2.1 Einsatz von alternativen Monosacchariden

Um das Potenzial dieser Kultivierungsstrategie zu untersuchen, wurden zunächst zwei Kultivierungen mit dem Substrat Fructose bzw. Xylose durchgeführt. Die entsprechenden Kultivierungsverläufe sind in Abbildung 4.46 vergleichend dargestellt. Zusätzlich wurde zur Dokumentation der Morphologie die vorliegende Biomasse nach einer Kultivierungsdauer von 3 d analysiert und in Abbildung 4.47 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

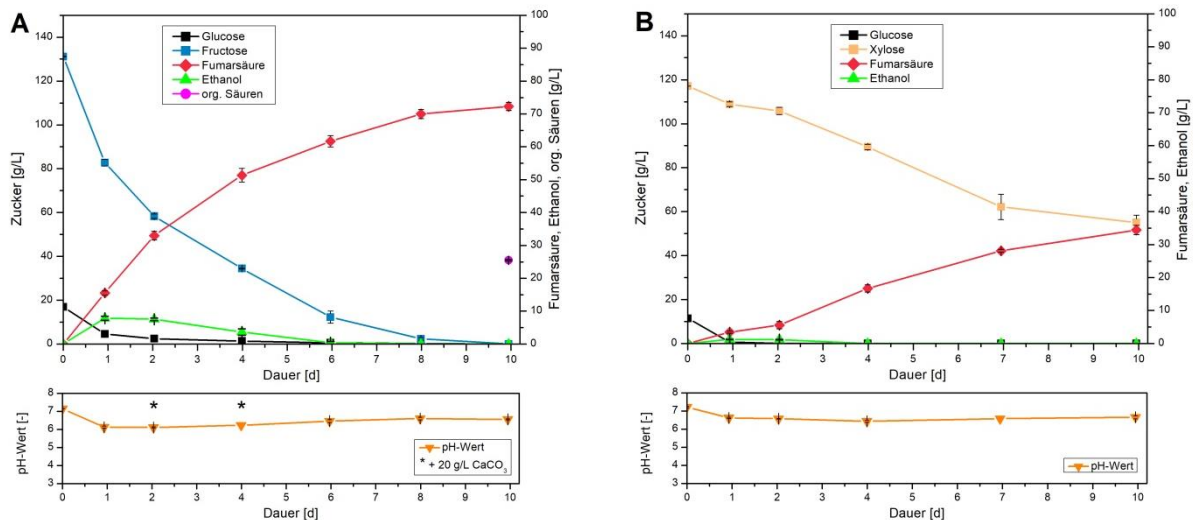


Abbildung 4.46: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); A - Kultivierung auf Basis von Fructose, B - Kultivierung auf Basis von Xylose.

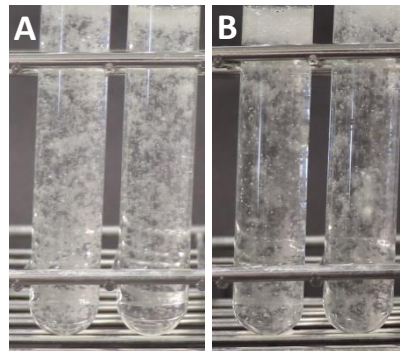


Abbildung 4.47: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit Vorkultur und optimiertem Medium C nach 3 d; A - Aufnahme der Kultivierung mit Fructose, B - Aufnahme der Kultivierung mit Xylose.

Anhand der makroskopischen Aufnahmen der Morphologie konnte bei beiden Zuckertypen die Ausbildung von losem Mycelium festgestellt werden. Somit konnte im Gegensatz zur Kultivierungsstrategie mit direkter Sporeninokulation (s. Kapitel 2.2.1) ein Zusammenlagern der Biomasse über den gesamten Kultivierungszeitraum erfolgreich verhindert werden. Diese deutlich verbesserte Morphologie spiegelte sich auch im Produktionsverhalten von *R. arrhizus* NRRL 1526 wider. So konnte bei der Kultivierung mit Fructose nach einer Dauer von 10 d und dem vollständigen Verbrauch von Fructose eine Endkonzentration von 72,3 g/L Fumarsäure detektiert werden. Interessant ist hierbei, dass zu Beginn der Kultivierung und während des Vorliegens von eingetragener Glucose, eine konstante Produktivität an Fumarsäure von 0,68 g/(L·h) innerhalb der ersten beiden Tage festgestellt wurde. Nach der vollständigen Verstoffwechselung der über die Vorkultur eingetragenen Glucose konnte dagegen, unter weiterem Verbrauch von Fructose, ein Rückgang der Produktivität dokumentiert werden. Dieses Verhalten deutet somit auf eine begünstigte Produktion von Fumarsäure beim Vorliegen von geringen Konzentrationen an Glucose hin. Im Gegensatz hierzu konnte bei der Kultivierung mit Xylose eine deutlich reduzierte Akkumulation von Fumarsäure nachgewiesen werden. Dies betraf sowohl den anfänglichen Kultivierungszeitraum bei dem noch Glucose vorlag, als auch den Zeitraum nach der Verstoffwechselung von Glucose. So konnte nach 10 d und dem nicht vollständigen Verbrauch von Xylose eine Konzentration von lediglich 34,5 g/L Fumarsäure festgestellt werden. Ein

Vergleich dieser Kultivierung mit Literaturangaben liefert ein übereinstimmendes Ergebnis. So wurden beispielsweise in Kautola et al. (1989) und in Xu et al. (2016) ebenfalls nur geringe Mengen an Fumarsäure auf Basis von Xylose mittels *Rhizopus* sp. produziert.

Zusammenfassend konnte anhand der vergleichenden Darstellung eine erhöhte Verstoffwechselungs-rate bei der Verwendung von Fructose gegenüber Xylose aufgezeigt werden. Dies resultierte in einer um 110 % gesteigerten Endkonzentration an Fumarsäure nach 10 d unter Einsatz von Fructose. Somit zeigt dieses Ergebnis auf, dass mit Fructose ein weiteres Monosaccharid identifiziert werden konnte, das sich prinzipiell für die Produktion von Fumarsäure eignet.

4.2.2.2 Einsatz von synthetischen Zuckermischungen

Hinsichtlich einer möglichen fermentativen Verstoffwechselung von agrarischen Reststoffen ist zu beachten, dass bei diesen Kultivierungen nicht nur ein Monosaccharid als Zuckerquelle vorliegt. Vielmehr treten bei der Verwendung von nachwachsenden Reststoffen verschiedene Monosaccharide auf, die je nach Art des Rohstoffs und dessen Verarbeitung in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen können. Um diese Tatsache unter idealen Bedingungen zu simulieren, wurden weitere Kultivierungen mit der zuvor angewendeten Vorkulturstrategie durchgeführt. Hierbei wurde zum einen die Zuckerszusammensetzung eines agrarischen Reststoffs verwendet, der bei der Verarbeitung von Früchten anfällt. Als Modellsubstanz wurde hierfür Apfeltrester herangezogen, der neben Fructose und Glucose auch weitere Zucker wie beispielsweise Saccharose enthält. Als zweite Modellsubstanz diente Weizenkaff. Hierbei handelt es sich um einen lignocellulosehaltigen Reststoff, der beim Anbau von Weizen anfällt und neben Glucose vor allem Xylose enthält (Anders, 2014). Das exakte Zuckerverhältnis, das für die folgenden Kultivierungen verwendet wurde, ist in Tabelle 4.5 vergleichend dargestellt.

Tabelle 4.5: Anteilige Zuckerszusammensetzung der Modellsubstanzen Apfeltrester und Weizenkaff

Zucker	Apfeltrester [%]	Weizenkaff [%]
Glucose	30,4	54,8
Fructose	63,7	
Saccharose	4,2	
Xylose	0,9	45,2
Galactose	0,5	
Arabinose	0,3	

Basierend auf diesen Zuckerverhältnissen wurden synthetische Medien hergestellt, die jeweils eine Gesamtkonzentration von 130 g/L Zucker aufwiesen. Das entsprechende Medium wurde anschließend in der Hauptkultur eingesetzt und mit Vorkultur angeimpft. Für beide Ansätze ist der erzielte Kultivierungsverlauf in Abbildung 4.48 vergleichend dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

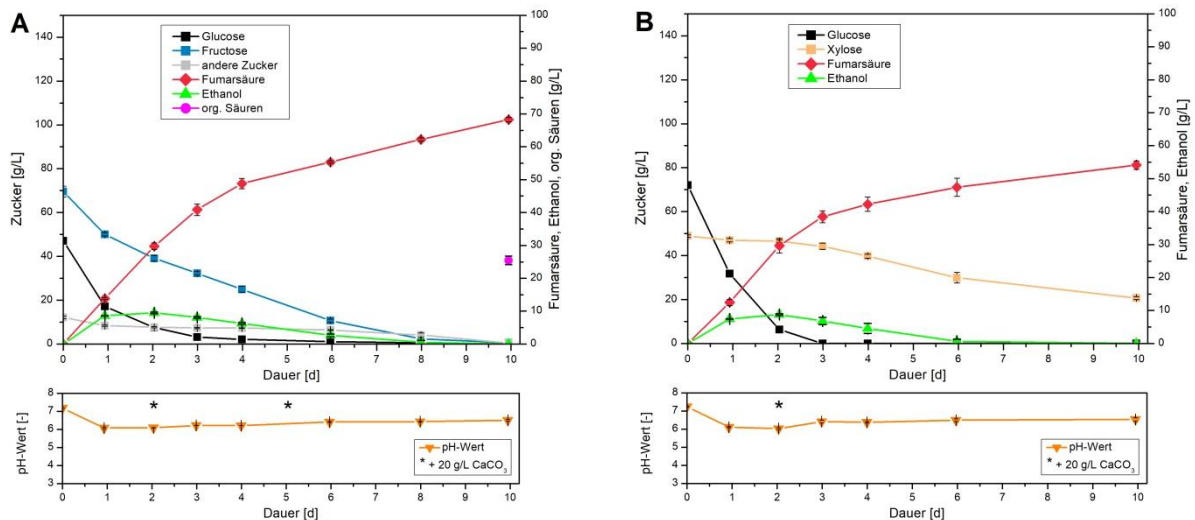


Abbildung 4.48: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR); A - Kultivierung auf Basis von synthetischem Apfeltrester-Medium, B - Kultivierung auf Basis von synthetischem Weizenkaff-Medium.

Dabei konnte unter Verwendung des synthetischen Apfeltrester-Mediums innerhalb des ersten Tages eine hohe Abnahme der Glucosekonzentration detektiert werden. Der Verbrauch an Fructose und anderen Zuckern zeigte dagegen eine geringere Verstoffwechselungsrate auf. Somit kann unter der hier verwendeten Kultivierungsstrategie belegt werden, dass Glucose das bevorzugte Monosaccharid von *R. arrhizus* NRRL 1526 war. Bezogen auf die Produktion von Fumarsäure konnte unter Präsenz von Glucose eine Produktivität von 0,51 g/(L·h) innerhalb der ersten vier Tage nachgewiesen werden. Im weiteren Kultivierungsverlauf und nach dem vollständigen Aufbrauchen von Glucose wurde dagegen ein Rückgang der Produktivität festgestellt. Dieses Verhalten bestätigt somit die zuvor getroffene Annahme, dass die Präsenz von Glucose positive Auswirkungen auf die Fumarsäureproduktion mittels anderer Zucker hat. Insgesamt wurde nach einer Kultivierungsdauer von 10 d und der vollständigen Verstoffwechselung aller eingesetzten Zucker eine Endkonzentration von 68,3 g/L Fumarsäure erzielt.

Im Gegensatz hierzu konnte bei der Kultivierung mit dem synthetischen Weizenkaff-Medium nach 10 d ein geringerer Endtiter von 54,1 g/L festgestellt werden. Dabei zeigte das Kultivierungssystem zunächst ein vergleichbares Produktionsverhalten innerhalb der ersten drei Tage auf. Anzumerken ist hierbei, dass die Produktion von Fumarsäure vor allem auf der Verstoffwechselung von Glucose basierte. So konnte nach drei Tagen das vollständige Aufbrauchen der eingesetzten Glucose nachgewiesen werden. Dagegen wurden im selben Kultivierungszeitraum lediglich 10 % der initialen Xylose verbraucht. Im weiteren Kultivierungsverlauf konnte eine zunehmende Verstoffwechselung von Xylose festgestellt werden, die allerdings keinen Vollumsatz innerhalb des untersuchten Zeitraums ermöglichte. Somit kann anhand dieses Kultivierungsergebnisses erneut bestätigt werden, dass Xylose gegenüber Fructose ein geringeres Potenzial zur Produktion von Fumarsäure aufzeigte.

Ein Vergleich dieser beiden Kultivierungen mit der zuvor untersuchten Einflussnahme von einzelnen Monosacchariden (vgl. Kapitel 4.2.2.1) zeigt einen interessanten Unterschied bezüglich einer Umstellung der Zuckerverstoffwechselung auf. So konnte beim Einsatz von ausschließlich einem Monosaccharid (Fructose oder Xylose) ein früheres Aufbrauchen der über die Vorkultur eingetragenen Glucose beobachtet werden. Die anschließend notwendige Umstellung des Stoffwechselwegs auf den

noch verbleibenden Zucker erfolgte somit zu einem früheren Kultivierungszeitpunkt. Dabei resultierte diese Tatsache gegenüber einem späteren Aufbrauchen von Glucose in einer erhöhten Produktion von Fumarsäure auf Basis des noch vorliegenden Zuckertyps. So konnte beispielsweise unter Verwendung von ausschließlich Xylose in der Hauptkultur, nach dem Verbrauch der eingetragenen Glucose, eine Produktivität von 0,15 g/(L·h) festgestellt werden. Dagegen zeigte die Kultivierung mit dem synthetischen Weizenkaff-Medium eine reduzierte Produktivität von 0,09 g/(L·h) nach dem vollständigen Aufbrauchen von Glucose auf. Somit kann anhand dieser Beobachtung belegt werden, dass sich ein frühzeitiger Wechsel des Stoffwechselwegs von Glucose auf einen anderen Zucker positiv auf die Fumarsäureproduktion auswirkt.

Auch in der Literatur wurde bereits der Einfluss von unterschiedlichen Zuckermischungen auf das Produktionsverhalten von *Rhizopus* sp. untersucht. So wurde beispielsweise in Papadaki et al. (2018) der Einfluss einer Zuckermischung von 50 % Glucose und 50 % Fructose untersucht. Mit einer initialen Zuckerkonzentration von 50 g/L konnte in dieser Publikation eine Konzentration von 30,8 g/L Fumarsäure erzielt werden. Ergänzend hierzu wurden in Liu et al. (2017) Kultivierungen mit einer *Rhizopus* sp. und unterschiedlichen Zuckerverhältnissen an Glucose und Xylose durchgeführt. Als ideales Verhältnis wurde in dieser Veröffentlichung ein Anteil von 75 % Glucose und 25 % Xylose beschrieben, das mit einer Zuckerkonzentration von 80 g/L die Produktion von 46,8 g/L Fumarsäure ermöglichte. Bei beiden Publikationen konnte anhand des Kultivierungsverlaufs eine bevorzugte Verstoffwechslung von Glucose gegenüber Fructose bzw. Xylose festgestellt werden. Diese Feststellung steht in Übereinstimmung mit den in diesem Kapitel beschriebenen Kultivierungsergebnissen.

4.2.2.3 Vergleich mit der Kultivierung auf Basis von Glucose

Um die zuvor beschriebenen Kultivierungsansätze abschließend bewerten zu können, sind die erzielten Kultivierungsergebnisse in Abbildung 4.49 vergleichend dargestellt. Zusätzlich ist in dieser Abbildung das Kultivierungsergebnis enthalten, das mittels Vorkulturstrategie und Glucose erzielt wurde. Analog zu den zuvor gezeigten Kultivierungen wurde bei diesem Versuch ebenfalls durch eine mehrmalige Zugabe von Calciumcarbonat der pH-Wert über den gesamten Kultivierungszeitraum reguliert. Außerdem wiesen die Kultivierungen eine vergleichbare Mycel-Morphologie auf (vgl. Kapitel 4.1.4.1). Aufgetretene Unterschiede können somit direkt auf die Verwendung von verschiedenen Zuckertypen und Konzentrationsverhältnissen zurückgeführt werden.

Die vergleichende Darstellung der Kultivierungsergebnisse zeigt, dass unter identischen Kultivierungsbedingungen bei der Verwendung von Glucose das beste Produktionsverhalten erzielt wurde. So konnte bei der Referenzkultivierung mit Glucose eine Ausbeute von 0,63 g/g festgestellt werden. Mit 0,49 g/g unter Verwendung von Fructose bzw. 0,47 g/g bei Xylose wurden ca. 25 % geringere Ausbeuten erzielt. In diesem Zusammenhang lieferte der Einsatz einer Zuckermischung von Fructose und Glucose (synthetisches Apfeltrester-Medium) zwar eine verbesserte Ausbeute. Allerdings konnte hierbei nicht die hohe Ausbeute bei der Kultivierung mit ausschließlich Glucose erreicht werden. Ein vergleichbares Ergebnis konnte bei der Verwendung des synthetischen Weizenkaff-Mediums festgestellt werden. Dieses lieferte eine um 15 % gesteigerte Ausbeute im Vergleich zur Kultivierung mit ausschließlich Xylose.

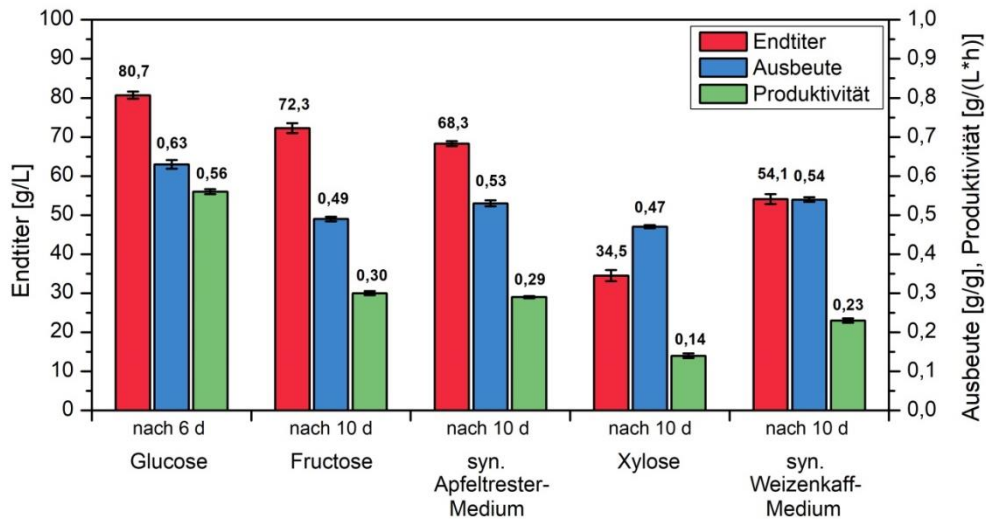


Abbildung 4.49: Einfluss des verwendeten Zuckertyps auf die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit Vorkultur und optimiertem Medium C (130 g/L Gesamtzucker) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO₃.

Neben einer geringeren Ausbeute wurde ebenfalls eine reduzierte Gesamtproduktivität bei Verwendung von alternativen Zuckern festgestellt. So konnte bei vergleichbaren initialen Zuckerkonzentrationen im Zuge der Referenzkultivierung mit Glucose ein Vollumsatz nach einer Kultivierungsdauer von 6 d detektiert werden. Bei der Kultivierung mit Fructose wurde hierfür ein Zeitraum von 10 d benötigt. Dies spiegelt sich in einer um ca. 45 % geringeren Produktivität wider. In diesem Zusammenhang lieferte eine zusätzliche Erhöhung der Glucosekonzentration (synthetisches Apfeltrester-Medium) keine Steigerung der Produktivität. Bezogen auf das Kultivierungsergebnis von Xylose konnte keine vollständige Verstoffwechslung des vorgelegten Zuckers erreicht werden. Dieser Kultivierungsansatz ermöglichte lediglich eine Gesamtproduktivität von 0,14 g/(L·h) nach 10 d. Durch eine erhöhte Glucosekonzentration bei der Verwendung des synthetischen Weizenkaff-Mediums ließ sich die Gesamtproduktivität zwar auf 0,23 g/(L·h) steigern, allerdings stellt dieses Ergebnis im Vergleich zur Kultivierung mit synthetischem Apfeltrester-Medium eine um 21 % geringere Produktivität dar.

Zusammenfassend kann somit auf Grundlage dieser Ergebnisse eine Reihenfolge der verschiedenen getesteten Monosaccharide festgelegt werden. So eignet sich das Monosaccharid Glucose unter Verwendung der hier untersuchten Kultivierungsbedingungen am besten für die fermentative Produktion von Fumarsäure. Darauf folgt Fructose, das bei Kultivierungen zwar geringere Ausbeuten und Produktivitäten lieferte, aber prinzipiell zur Produktion von Fumarsäure verwendet werden kann. Dagegen konnte unter Verwendung von Xylose und *R. arrhizus* NRRL 1526 keine ausreichende Verstoffwechslung erzielt werden, die eine effektive Produktion von Fumarsäure ermöglicht hätte. Hinsichtlich einer potenziellen Verwendung von agrarischen Reststoffen liefert somit eine Nutzung von ausschließlich lignocellulosehaltiger Biomasse nur ein sehr geringes Potenzial. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen bezüglich dieser Art an nachwachsendem Reststoff angestellt. Die getestete Zuckerzusammensetzung der Modellsubstanz Apfeltrester zeigte dagegen ein vielversprechendes Potenzial auf, um Fumarsäure auch ohne den ausschließlichen Einsatz von Glucose zu produzieren. Daher wurde im folgenden Kapitel das Produktionsverhalten unter Verwendung von Fructose sowie des synthetischen Apfeltrester-Mediums bei Kultivierungen mit separater Produktion von Biomasse genauer untersucht.

4.2.3 Kultivierung mit separater Biomasseproduktion

Um den Einfluss einer vollständig wachstumsentkoppelten Fumarsäureproduktion bei Verwendung von alternativen Zuckern zu untersuchen, wurde die Kultivierungsstrategie mit separater Produktion von Biomasse angewendet. Hierzu wurde analog zu Kapitel 4.1.7 zunächst mittels einer zweistufigen Vorkultur Biomasse angezogen, anschließend von Vorkulturmedium befreit und gewaschen. Die dadurch hergestellte Biomassesuspension wurde zum Animpfen der Hauptkultur verwendet, bei der durch vollständige Stickstofflimitierung ein weiteres Biomassewachstum verhindert wurde. Um während der zweistufigen Vorkultur die Ausbildung von loser Mycel-Morphologie zu gewährleisten, wurde in diesen Prozessschritten ausschließlich Glucose verwendet. Durch das anschließende Waschen der Biomasse wurde noch vorliegende Glucose vollständig entfernt. Somit konnte im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Kultivierungsstrategie mit Vorkultur das Produktionsverhalten ohne einen zusätzlichen Eintrag von Glucose untersucht werden (vgl. Kapitel 4.2.2.1). Unter Verwendung des Monosaccharids Fructose und der Zuckermischung des synthetischen Apfeltrester-Mediums sind die erzielten Kultivierungsverläufe in Abbildung 4.50 vergleichend dargestellt.

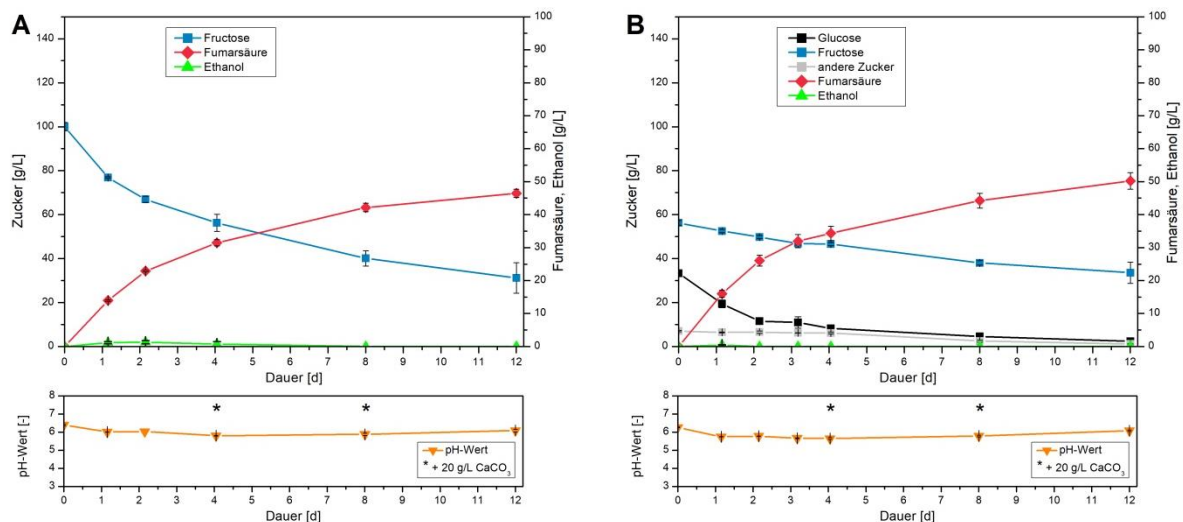


Abbildung 4.50: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und optimiertem Medium C (ohne Ammonium) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO₃; A - Kultivierung auf Basis von Fructose, B - Kultivierung auf Basis von synthetischem Apfeltrester-Medium.

Dabei konnte unter Verwendung von ausschließlich Fructose zu Beginn der Kultivierung eine hohe Verstoffwechselung dieses Monosaccharids beobachtet werden. Im weiteren Verlauf war die Abnahme von Fructose allerdings rückläufig. So betrug der Umsatz nach einer Kultivierungsdauer von 12 d lediglich 69 % der initial eingesetzten Fructose. Entsprechend der Verstoffwechselung von Fructose wurde zu Beginn der Kultivierung eine gesteigerte Zunahme der Konzentration an Fumarsäure detektiert, die mit fortschreitender Dauer der Kultivierung immer weiter abnahm. Nach 12 d konnte hierbei ein Endtiter von 46,4 g/L Fumarsäure erreicht werden.

Unter Einsatz der Zuckermischung, die sich an der Zuckerzusammensetzung von Apfeltrester orientierte (s. Tabelle 4.5), konnte ein vergleichbares Produktionsverhalten während der Kultivierung dokumentiert werden. So zeigte *R. arrhizus* NRRL 1526 innerhalb der ersten drei Tage eine erhöhte Produktivität an Fumarsäure, die hauptsächlich auf die Verstoffwechselung von Glucose zurückzuführen war. Nach dem fast vollständigen Aufbrauchen von Glucose und einer weiterhin linear abnehmenden

Fructosekonzentration wurde anschließend ein Rückgang der Produktivität detektiert. Dies resultierte in einer Endkonzentration an Fumarsäure von 50,2 g/L nach 12 d. Zur Produktion dieser Konzentration an Fumarsäure wurden insgesamt 62 % der eingesetzten Menge an Zuckern verstoffwechselt. Dabei verdeutlicht ein Vergleich der Verstoffwechselungsraten, bezogen auf die unterschiedlich eingesetzten Monosaccharide, die bevorzugte Nutzung von Glucose. So wurden 93 % der initial eingesetzten Glucose während der Kultivierung verbraucht. Mit 40 % bzw. 84 % zeigten Fructose und die Summe der anderen Zucker geringere Verstoffwechselungsraten auf.

Bezogen auf die erzielte Morphologie konnte bei beiden Kultivierungsansätzen die Ausbildung von losen und einzeln vorliegenden Mycelflocken beobachtet werden (s. Abbildung 4.51). Es handelte sich hierbei um den Morphologietyp, der bei bisherigen Schüttelkolbenkultivierungen die besten Produktionseigenschaften aufzeigte.

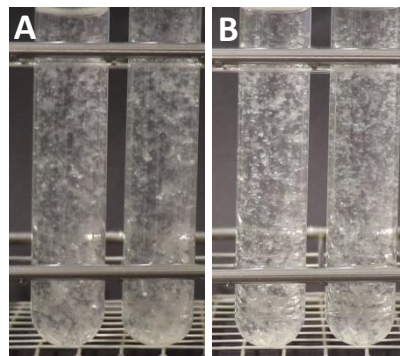


Abbildung 4.51: Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei der Kultivierung mit separater Biomasseproduktion und optimiertem Medium C (ohne Ammonium) nach 6 d; A - Aufnahme der Kultivierung mit Fructose, B - Aufnahme der Kultivierung mit synthetischem Apfeltrester-Medium.

Um die hier erzielten Kultivierungsergebnisse abschließend vergleichen zu können und in den Kontext dieser Arbeit einzuordnen, ist in Abbildung 4.52 ein Vergleich mit der Referenzkultivierung auf Basis von Glucose und separater Biomasseproduktion dargestellt.

Die Kultivierung mit ausschließlich Glucose ermöglichte hierbei ebenfalls keinen Vollumsatz der initialen Glucosekonzentration von 100 g/L innerhalb des untersuchten Kultivierungszeitraums. Allerdings konnten innerhalb von 7 d ca. 75 % der ursprünglich eingesetzten Menge an Glucose verstoffwechselt werden. Dies ermöglichte die Produktion von 57,8 g/L Fumarsäure, bei einer Ausbeute von 0,73 g/g und einer Gesamtproduktivität von 0,35 g/(L·h). Im Vergleich hierzu konnte beim Einsatz von Fructose ein deutlich geringerer Zuckerumsatz detektiert werden. Dies resultierte zum einen in einer Verlängerung der Kultivierungsdauer, um eine vergleichbare Menge an Zucker umzusetzen. Zum anderen wurde aufgrund des geringen Zuckerumsatzes nur eine sehr niedrige Gesamtproduktivität von 0,16 g/(L·h) erzielt. Bezogen auf die Verwendung einer Zuckermischung, die neben Glucose und Fructose auch geringe Konzentrationen von weiteren Zuckern enthielt, wurde eine fast identische Gesamtproduktivität von 0,17 g/(L·h) nach 12 d festgestellt. Im Vergleich zur Referenzkultivierung mit Glucose entspricht dies einer Reduktion der Produktivität um ca. 50 %. Hervorzuheben ist bei der Kultivierung mit synthetischem Apfeltrester-Medium die sehr hohe Ausbeute von 0,82 g/g. Im Vergleich zur Kultivierung mit Glucose stellt dies eine Verbesserung um 23 % dar. Außerdem handelt es sich hierbei um die höchste Ausbeute, die unabhängig vom eingesetzten Zuckertyp in Rahmen dieser Arbeit erzielt werden konnte.

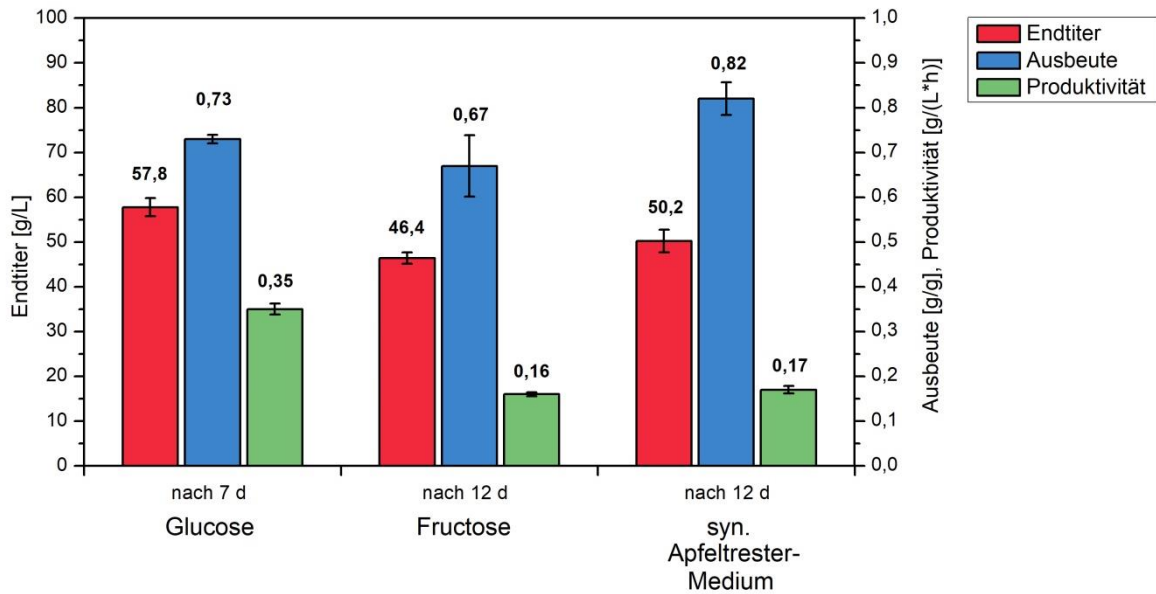


Abbildung 4.52: Einfluss des verwendeten Zuckertyps auf die Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und optimiertem Medium C (ohne Ammonium, 100 g/L Gesamtzucker) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO₃ (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO₃.

Zusammenfassend konnte somit aufgezeigt werden, dass sich die Kultivierungsstrategie mit einer separaten Biomasseproduktion und der anschließenden wachstumsentkoppelten Produktion von Fumarsäure prinzipiell auch für den Einsatz von Fructose und die in Apfeltrester enthaltenen Zucker eignet. Einschränkend ist hierbei zu erwähnen, dass bei dieser Kultivierungsstrategie nur eine sehr langsame Verstoffwechslung der verwendeten Zucker möglich ist. Diese Tatsache resultierte im Vergleich zu entsprechenden Kultivierungen mit Vorkultur (vgl. Kapitel 4.2.2.3) in sehr geringen Gesamtproduktivitäten, was die Effektivität des Gesamtprozesses einschränkt. Neben diesem Nachteil ermöglichte die wachstumsentkoppelte Produktion von Fumarsäure allerdings deutlich gesteigerte Ausbeuten. So konnte unter Verwendung des synthetischen Apfeltrester-Mediums die höchste Ausbeute der gesamten Arbeit erzielt werden.

4.3 Produktion von Fumarsäure auf Basis von Apfeltrester

Um die in Apfeltrester enthaltenen Zucker für die biotechnologische Produktion von Fumarsäure zu verwenden, können prinzipiell zwei unterschiedliche Prozessansätze verwendet werden. So kann Apfeltrester direkt als Feststoff in Kultivierungen mit *R. arrhizus* NRRL 1526 eingesetzt werden. Hierbei findet neben der fermentativen Produktion von Fumarsäure, durch den Einsatz von Enzymen, zeitgleich eine Monomerisierung der strukturell gebundenen Polysaccharide statt. Diese Form der Prozessführung wird daher als simultane Verzuckerung und Fermentation bezeichnet. Alternativ hierzu kann in einer separaten Prozessstufe auf Basis von Apfeltrester zunächst eine zuckerhaltige Flüssigkeit hergestellt werden. In der anschließenden Kultivierung dient diese dann als Kohlenstoff- und Energiequelle zur Produktion von Fumarsäure. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese beiden Prozessstrategien untersucht und in den folgenden Kapiteln beschrieben. Vorbereitend hierzu wurde Apfeltrester zunächst bezüglich allgemeiner Stoffeigenschaften und der enthaltenen Zuckerzusammensetzung charakterisiert.

4.3.1 Charakterisierung von Apfeltrester

Der in dieser Arbeit verwendete Apfeltrester wurde vom Fruchtsafthersteller riha WeserGold bezogen (s. Abbildung 4.53). Es handelt sich hierbei um Apfeltrester der bei der Herstellung von Direktsaft angefallen ist.



Abbildung 4.53: Apfeltrester von riha WeserGold

4.3.1.1 Restfeuchte, Asche- und Stickstoffgehalt von Apfeltrester

Zur Bestimmung des Trockengehalts bzw. der Restfeuchte, die noch in Apfeltrester enthalten ist, wurden Proben bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gravimetrisch analysiert. Die anschließende Veraschung des getrockneten Apfeltresters erfolgte bei 550 °C in einem Muffelofen. Um den Anteil an Stickstoff in Apfeltrester zu bestimmen, wurde die Analysemethode nach Kjeldahl angewendet. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 4.6 dargestellt. Die Tabelle enthält zusätzlich das Ergebnis der Biotrockenmasse-Bestimmung von Apfeltrester, die von riha WeserGold auf Basis derselben Charge an Äpfeln im Jahr 2015 durchgeführt wurde (riha WeserGold - Untersuchung von Trester, 2015).

Tabelle 4.6: Charakteristische Eigenschaften von Apfeltrester im Vergleich zur Analyse von riha WeserGold (2015).

		diese Arbeit	riha WeserGold (2015)
Biotrockenmasse	[%]	26,6 ± 0,3	21,5
Restfeuchte	[%]	73,4	78,5
Aschegehalt	[% _{BTM}]	1,2 ± 0,1	
Stickstoffgehalt	[% _{BTM}]	1,1 ± 0,0	

Die Bestimmung der Biotrockenmasse zeigt auf, dass mit 73,4 % (w/w) in dem hier untersuchten Apfeltrester noch eine große Menge von nicht abgepresstem Apfelsaft enthalten ist. Die Analyse von riha WeserGold lieferte mit 78,5 % (w/w) sogar eine um ca. 7 % erhöhte Restfeuchte. Als Grund für die unterschiedlichen Biotrockenmassen bzw. Restfeuchten des Apfeltresters kann die unterschiedlich lange Lagerungsdauer der Äpfel vor der Pressung angeführt werden. Nach Schobinger et al. (2001) beeinflusst dieser Einflussfaktor maßgeblich die Pressausbeute bei der Herstellung von Apfelsaft und die daraus resultierende Restfeuchte des Apfeltresters. So wurde bei der Bestimmung der Biotrockenmasse von riha WeserGold Apfeltrester verwendet, der bei einer Pressung kurz nach der Apfelernte anfiel (September 2015). Der Apfeltrester, der in dieser Arbeit verwendet wurde, fiel dagegen bei einer Pressung im Mai 2016 an. Die hierfür verwendeten Äpfel wurden bis zur weiteren Verarbeitung somit über einen deutlich längeren Zeitraum zwischengelagert. Allgemein kann das hier vorliegende Verhältnis von Biotrockenmasse und Restfeuchte als typisches Ergebnis beim Pressen von Äpfeln bezeichnet werden. So werden in mehreren Publikationen, die sich mit einer weiteren stofflichen Nutzung von Apfeltrester beschäftigen, Restfeuchten von 70 - 80 % genannt (Joshi und Attri, 2005; Sun et al., 2007; Vendruscolo et al., 2008). Bezogen auf den Asche- und Stickstoffgehalt von Apfeltrester konnten ebenfalls vergleichbare Werte in Publikationen gefunden werden (Jin et al., 2002; Sudha et al., 2007). In diesem Zusammenhang stellt der Nachweis von organisch gebundenem Stickstoff (beispielsweise in Proteinen) eine interessante Information dar, bezüglich einer späteren fermentativen Verwendung des Apfeltresters als Ausgangssubstrat für Kultivierungen.

4.3.1.2 Fraktionierung von Apfeltrester

Wie in Cargnin et al. (2017) beschrieben, handelt es sich bei Apfeltrester um einen heterogen zusammengesetzten Rohstoff, der verschiedene Fraktionen von Apfelbestandteilen enthält. So weist Apfeltrester neben Fruchtfleisch, zerkleinerter Schale und Kerngehäuse auch Kerne und Stiele auf. Um die einzelnen Anteile dieser Bestandteile zu quantifizieren, wurde Apfeltrester händisch fraktioniert und der Gewichtsanteil, der bei 105 °C getrockneten Fraktionen, gravimetrisch analysiert. In Abbildung 4.54 sind die erhaltenen Fraktionen abgebildet und in Tabelle 4.7 das Ergebnis der Quantifizierung dargestellt.



Abbildung 4.54: Fraktionierung von Apfeltrester; A - Fruchtfleisch, Schale und Kerngehäuse, B - Kerne, C - Stiele.

Tabelle 4.7: Verschiedene Bestandteile von Apfeltrester mittels händischer Fraktionierung und Trocknung bei 105 °C.

Fraktion	Gewichtsanteil [% _{BTM}]
Fruchtfleisch, Schale, Kerngehäuse	97,8 ± 0,3
Kerne	0,9 ± 0,1
Stiele	1,3 ± 0,2

Bezogen auf die Biotrockenmasse bildete die Summe aus Fruchtfleisch, Schale und Kerngehäuse mit 97,8 % (w/w) die größte Fraktion des untersuchten Apfeltresters. Mit 0,9 % bzw. 1,3 % ist der Anteil von Kernen und Stielen dagegen sehr gering. Somit haben spezifische Eigenschaften dieser beiden Fraktionen, wie beispielsweise der hohe Fettsäure- und Protein-Anteil von Kernen oder die robuste Lignocellulose-Struktur der Stiele, nur einen vernachlässigbaren Einfluss bei später durchgeführten Fermentationen (Yu et al., 2007). Für eine weitere Charakterisierung des Apfeltresters wurde daher auf eine getrennte Analyse und Bewertung der einzelnen Bestandteile verzichtet. Vielmehr wurde der hier untersuchte Apfeltrester als ein homogener vorliegender Rohstoff behandelt.

4.3.1.3 Anteil und Zusammensetzung der Zucker in Apfeltrester

Für eine spätere fermentative Herstellung von Fumarsäure ist der Anteil an Zuckern in Apfeltrester entscheidend. Prinzipiell können die in Apfeltrester enthaltenen Zucker in zwei Klassen, freie und strukturelle Zucker, unterteilt werden. Als freie Zucker werden hierbei wasserlösliche Zucker bezeichnet, die bereits als Mono- bzw. Disaccharide im Substrat vorliegen. In Apfeltrester sind dies Glucose, Fructose und Saccharose. In diesem Zusammenhang konnte bereits eine sehr hohe Restfeuchte im Apfeltrester festgestellt werden, bei der es sich um nicht abgepressten Apfelsaft handelt (s. Kapitel 4.3.1.1). Aufgrund der hohen Zuckerkonzentration von Apfelsaft (ca. 105 g/L, Direktsaft von riha WeserGold) konnte somit für den hier untersuchten Apfeltrester von einem hohen Anteil an freien Zuckern ausgegangen werden. Strukturelle Zucker liegen dagegen nicht in ihrer monomeren Form vor. Sie sind über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft und bilden die strukturellen Polysaccharide Cellulose und Hemicellulose (Lynd et al., 2002).

Um beide Zuckerklassen zu quantifizieren, wurden zunächst in einem Extraktionsschritt die freien Fruchtzucker unter schonenden Bedingungen (25 °C, pH 3,6) mittels Wasser vollständig extrahiert und analysiert. Auf Basis des verbleibenden Feststoffs wurden in einem zweiten Analyseschritt anschließend die strukturellen Zucker monomerisiert und analysiert. Dies erfolgte durch eine zweistufige Säurehydrolyse nach NREL (Sluiter et al. 2008). Die getrennte Analyse von freien und strukturellen Zuckern war notwendig, da Fructose unter den harschen Reaktionsbedingungen der Säurehydrolyse (121 °C, pH < 1) nicht stabil ist und somit nicht quantitativ bestimmt werden konnte. Die erzielten Zuckeranteile wurden mittels HPAEC-PAD-Analyse bestimmt und sind in Abbildung 4.55 dargestellt.

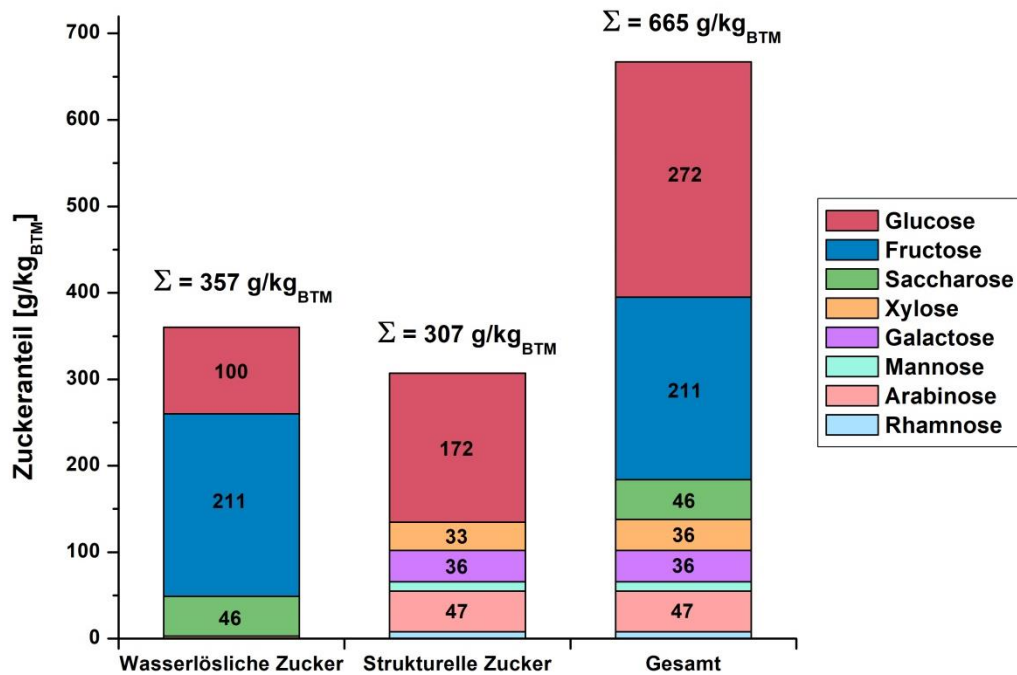


Abbildung 4.55: Anteile und Zusammensetzung der Zucker in Apfeltrester, mittels Wasser-Extraktion und zweistufiger Säurehydrolyse nach Sluiter et al. (2008).

Bezogen auf die wasserlöslichen Zucker konnte in Apfeltrester insgesamt ein Anteil von 357 g/kg_{BTM} detektiert werden. Mit 211 g/kg_{BTM} bildet Fructose innerhalb der freien Zucker die größte Fraktion, gefolgt von Glucose mit 100 g/kg_{BTM} und Saccharose mit 46 g/kg_{BTM}. Mit 307 g/kg_{BTM} war der Anteil an strukturellen Zuckern im Vergleich zu den wasserlöslichen Zuckern etwas geringer. Glucose, das Monosaccharid der Cellulose, stellte mit 172 g/kg_{BTM} die größte Fraktion dar. Die Monosaccharide der Hemicellulose konnten in geringeren Anteilen von 8 - 46 g/kg_{BTM} nachgewiesen werden. Insgesamt konnte somit, bezogen auf die Biotrockenmasse, ein Zuckeranteil von 66,5 % (w/w, \triangleq 665 g/kg_{BTM}) in Apfeltrester festgestellt werden. Die größten Fraktionen an Monosacchariden bildeten dabei Glucose mit 272 g/kg_{BTM}, gefolgt von Fructose mit 211 g/kg_{BTM}.

Bei einem Vergleich dieses Ergebnisses mit der Literatur ist prinzipiell zu beachten, dass eine Vielzahl von Einflussfaktoren den Zuckeranteil von Äpfeln bzw. Apfeltrester beeinflussen kann. Beispiele hierfür sind die Sorte an verwendeten Äpfeln, die Region des Anbaus und die Wetterbedingungen des entsprechenden Anbaujahres (Paganini et al., 2005; Vendruscolo et al., 2008). Außerdem hat die Prozessführung bei der Herstellung von Apfelsaft einen großen Einfluss auf die Zuckerzusammensetzung des dabei anfallenden Apfeltresters. So resultiert eine ausschließliche Pressung der Äpfel zur Herstellung von Direktsaft in einem hohen Anteil an nicht abgetrennten wasserlöslichen

Zuckern, die den Anteil an Gesamtzucker im Apfeltrester steigert. Dagegen weist Apfeltrester, der üblicherweise bei der Herstellung von Apfelsaftkonzentrat anfällt, einen geringeren Anteil an wasserlöslichen Zuckern auf. Begründet ist dies durch zusätzliche Extraktionsschritte, bei denen noch zurückgebliebene wasserlösliche Zucker extrahiert und abtrennt werden (Schobinger et al., 2001). Entsprechend dieser Feststellung kann der in dieser Arbeit untersuchte Apfeltrester, der bei der Herstellung von Direktsaft angefallen ist, als sehr zuckerreich bezeichnet werden. Dabei zeigen Untersuchungen von Schieber et al. (2003) und auch Joshi und Attri (2005) mit einem Gesamtanteil von ca. 60 % (w/w) vergleichbare Zuckeranteile auf. Anhand von verschiedenen Publikationen kann allerdings auch das Vorliegen von geringen Zuckeranteilen in Apfeltrester belegt werden. So beschreibt beispielsweise Feng et al. (2010) einen Anteil von lediglich 13,5 % (w/w) an wasserlöslichen Zuckern und einen Zuckergesamtanteil von 50,4 % (w/w), bezogen auf die Biotrockenmasse. Auch Parmar et al. (2013) beschreibt im Vergleich zum hier untersuchten Apfeltrester einen um ca. 50 % geringeren Anteil an wasserlöslichen Zuckern. Unter Berücksichtigung der strukturell gebundenen Zucker entspricht dies einem Gesamtzuckeranteil von lediglich 45,9 % (w/w).

Zusammenfassend konnte der von riha WeserGold zur Verfügung gestellte Apfeltrester als zuckerreicher Reststoff charakterisiert werden. So bestand der Apfeltrester, bezogen auf die Biotrockenmasse, zu 66,5 % (w/w) aus verschiedenen Zuckern, die entweder als freie, wasserlösliche Zucker vorlagen oder in Form von Polysacchariden strukturell gebunden waren. Unter Berücksichtigung der nach der Pressung noch vorliegenden Restfeuchte entspricht dies einem Gesamtanteil an Zuckern von 17,4 % (w/w). Hinsichtlich einer fermentativen Nutzung des Apfeltresters ist anzumerken, dass Glucose, gefolgt von Fructose, die größten Zuckerfraktionen bilden und auf Basis dieser beiden Monosaccharide bereits erfolgreich Kultivierungen zur Produktion von Fumarsäure durchgeführt wurden (s. Kapitel 4.1 und Kapitel 4.2). Somit stellt Apfeltrester ein vielversprechendes Ausgangssubstrat für die biotechnologische Herstellung von Fumarsäure dar.

4.3.2 Simultane Verzuckerung und Fermentation von Apfeltrester

Um auf Basis von Apfeltrester eine möglichst effektive Produktion von Fumarsäure zu gewährleisten, ist eine Verstoffwechslung von allen in Apfeltrester enthaltenen Zuckern erstrebenswert. Dabei kann die einfache Zugänglichkeit der freien, wasserlöslichen Zucker als vorteilhaft eingestuft werden. Um *R. arrhizus* NRRL 1526 auch die Nutzung von strukturell gebundenen Zuckern der Cellulose und Hemicellulose zu ermöglichen, ist allerdings eine Monomerisierung dieser Polysaccharide notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür das Enzympräparat Biogazyme 2x (ASA Spezialenzyme, Wolfenbüttel) verwendet. Es handelte sich hierbei um eine Enzymmischung, die sowohl Cellulasen als auch Hemicellulasen enthält und somit eine Monomerisierung aller strukturell in Apfeltrester gebunden Zucker ermöglichte.

Bei der Prozessstrategie der simultanen Verzuckerung und Fermentation findet sowohl die enzymatische Monomerisierung der Polysaccharide als auch die fermentative Umsetzung der Zucker zu Fumarsäure in einem Prozessschritt statt. Neben dem Potenzial der Einsparung von Prozesskosten, ist allerdings ein Kompromiss bezüglich der Prozesstemperatur und des pH-Wertes erforderlich. So weist das Enzympräparat Biogazyme 2x bei einer Temperatur von 50 °C und einem pH-Bereich von 4,2 - 4,8 die höchste Aktivität (200 FPU/g_{B2x}) auf (Eidt, 2015). Kultivierungen mit *R. arrhizus* NRRL 1526 werden dagegen bei einer deutlich geringeren Prozesstemperatur von 34 °C durchgeführt. Bezogen auf den pH-Wert weisen Kultivierungen durch den Einsatz von Calciumcarbonat idealerweise einen Wert von ca. 6,0 auf (s. Kapitel 4.1.4.5).

Auf Grundlage dieser Feststellungen wurde zunächst ein SSF-Prozess bei einer Temperatur von 34 °C und einem initialen pH-Wert von 4,2 durchgeführt. Zur Regulierung des pH-Wertes wurde 50 mM Citrat-Puffer (pH = 4,8) verwendet, der mit einem Volumen von 50 mL in den 500 mL Schüttelkolben ohne Schikane vorgelegt wurde. Um *R. arrhizus* NRRL 1526 eine ausreichende Menge an Zuckern zur Verfügung zu stellen, wurden 50 g feuchter Apfeltrester eingesetzt und eine Enzymmenge von 0,1 g Biogazyme 2x hinzugegeben. Bezogen auf die vorliegende Biotrockenmasse an Apfeltrester entsprach dies einem Anteil von 7,5 mg_{B2x}/g_{BTM} bzw. 1,5 FPU/g_{BTM} (Aktivität unter idealen Enzym-bedingungen). Zum Animpfen dieses Ansatzes wurde gewaschene und auf ein Volumen von 40 mL eingeeengte Biomasse verwendet. Die Produktion der Biomasse erfolgte dabei mit einer vorgeschalteten, dreitägigen Schüttelkolbenkultivierung mit direkter Sporeninokulation unter optimierten Kultivierungsbedingungen (s. Kapitel 4.1.3). Unter Berücksichtigung des verwendeten Gesamtvolumens wurde bei diesem SSF-Ansatz ein Feststoffanteil an trockenem Apfeltrester von 9,5 % (w/v) eingesetzt. Dies ist gleichbedeutend mit einer theoretisch eingesetzten Zucker-konzentration von 63,2 g/L, die sich in 34,0 g/L wasserlösliche Zucker und 29,2 g/L strukturell gebundene Zucker unterteilen lässt. Der erzielte Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.56 dargestellt.

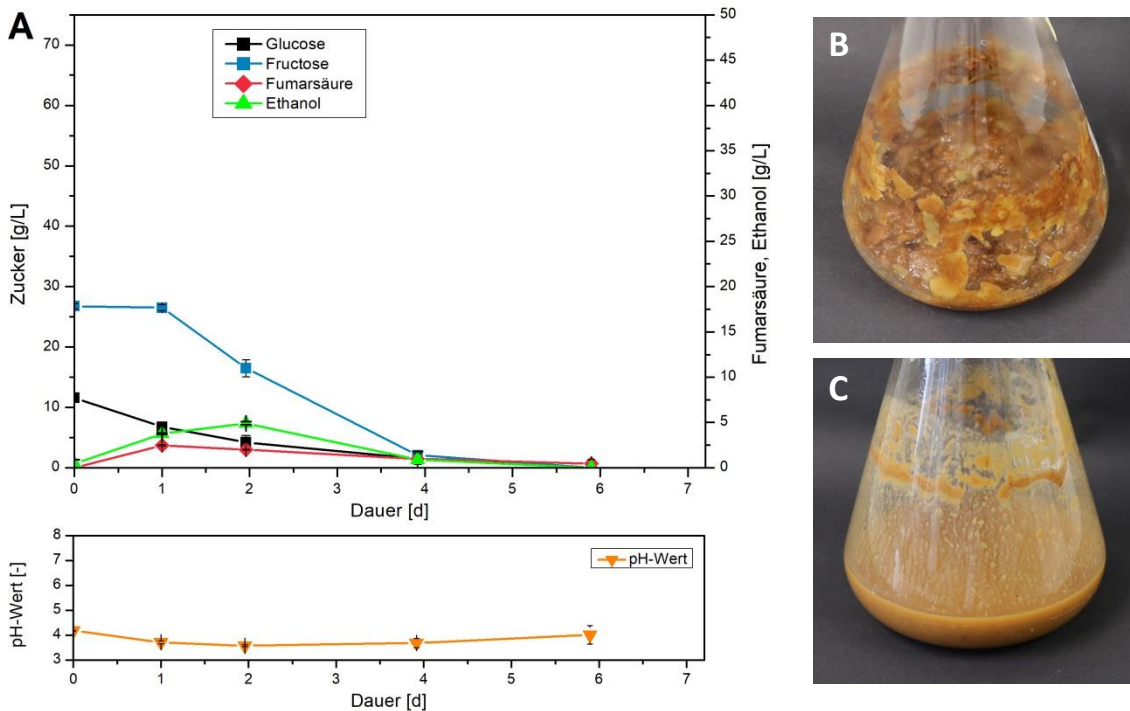


Abbildung 4.56: Simultane Verzuckerung von Apfeltrester mit 1,5 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x und Fermentation mit *R. arrhizus* NRRL 1526 in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und einer Regulierung des pH-Wertes mittels 50 mM Citrat-Puffer; A - Kultivierungsverlauf, B - Aufnahme des Schüttelkolbens nach 0 d, C - Aufnahme nach 4 d.

Bezogen auf das Monosaccharid Glucose konnte über den gesamten Kultivierungsverlauf eine konstante Abnahme der Konzentration detektiert werden, die nach 6 d ein vollständiges Aufbrauchen ermöglichte. Dabei ist zu beachten, dass die initiale Glucosekonzentration auf ausschließlich wasserlösliche Monosaccharide zurückzuführen war. In welchem Umfang strukturell gebundene Glucose während der Kultivierung enzymatisch monomerisiert wurden, kann dagegen anhand des Kultivierungsverlaufs nicht abgelesen werden. Somit zeigt der Verlauf der Glucosekonzentration lediglich ein Ungleichgewicht zwischen mikrobiellem Zuckerverbrauch und enzymatischer Monomerisierung von Cellulose auf. Dass bei diesem SSF-Ansatz prinzipiell strukturell gebundene Polysaccharide hydrolysiert wurden, konnte anhand einer deutlichen Verflüssigung des Kultivierungsansatzes belegt werden (vgl. Abbildung 4.56, B und C). So enthielt der SSF-Ansatz zu Beginn noch deutlich voneinander unterscheidbare Bestandteile des Apfeltresters wie beispielsweise Schalenfragmente oder Teile des Fruchtfleischs. Nach einer Dauer von 4 d zeigte der Ansatz dagegen ein homogeneres Erscheinungsbild, das nur noch kleine Fragmente der einzelnen Bestandteile von Apfeltrester enthielt.

In diesem Zusammenhang kann auch die anfängliche Akkumulation von Ethanol diskutiert werden, die vermutlich aufgrund der hohen anfänglichen Viskosität und der damit verbundenen geringen Sauerstoffversorgung des Pilzes verursacht wurde. Als weitere Möglichkeit ist allerdings auch ein zusätzliches Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 denkbar, das in bisherigen Referenz-kultivierungen ebenfalls die Bildung von Ethanol begünstigte (s. Kapitel 4.1). So enthält der hier verwendete Ansatz neben Apfeltrester auch das Enzympräparat Biogazyme 2x. Aufgrund des darin enthaltenen organischen Stickstoffs sowie Phosphat ist ein weiteres Wachstum des Pilzes prinzipiell denkbar. Bezogen auf Fructose, die ausschließlich in Form von Monosacchariden im feuchten Apfeltrester vorliegt, ist während der enzymatischen Hydrolyse mit keiner zusätzlichen Freisetzung zu rechnen. So konnte

innerhalb des ersten Tages eine gleichbleibende Konzentration detektiert werden. Im weiteren Kultivierungsverlauf nahm die Konzentration an Fructose ab und zeigte, analog zu Glucose, einen vollständigen Verbrauch nach 6 d auf. Somit wurde bei dem hier untersuchten SSF-Ansatz eine erfolgreiche Verstoffwechselung der zwei bedeutendsten Zucker aufgezeigt. Allerdings konnte hierbei nur eine sehr geringe Menge an Fumarsäure produziert werden. So erreichte das Kultivierungssystem nach einer Dauer von 1 d eine maximale Konzentration von lediglich 2,5 g/L Fumarsäure, die im weiteren Verlauf wieder abgebaut wurde.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde eine weitere Kultivierung mit SSF-Prozessführung durchgeführt. Dabei wurde das prinzipielle Vorgehen aus dem zuvor beschriebenen SSF-Prozess übernommen. Abweichend hierzu wurde zur Regulierung des pH-Wertes 50 g/L Calciumcarbonat verwendet. Dies ermöglichte, im Gegensatz zur Verwendung von Citrat-Puffer, eine Stabilisierung des pH-Wertes im Bereich von 5 - 6. Diese Bedingungen entsprachen somit eher dem pH-Wert, der bei bisherigen Referenzkultivierungen von *R. arrhizus* NRRL 1526 verwendet wurde. Neben einer veränderten pH-Regulierung wurde außerdem, anstelle von Citrat-Puffer, 50 mL des optimierten Mediums C eingesetzt. Aufgrund der darin enthaltenen Glucosekonzentration von 130 g/L wurde die initial vorliegende Gesamtmenge an Glucose zusätzlich erhöht. Außerdem enthielt das optimierte Medium C eine Konzentration von 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 0,3 g/L KH_2PO_4 . Dem verwendeten Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 wurde somit ein weiteres Wachstum während der Kultivierung ermöglicht. Der daraus resultierende Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.57 dargestellt.

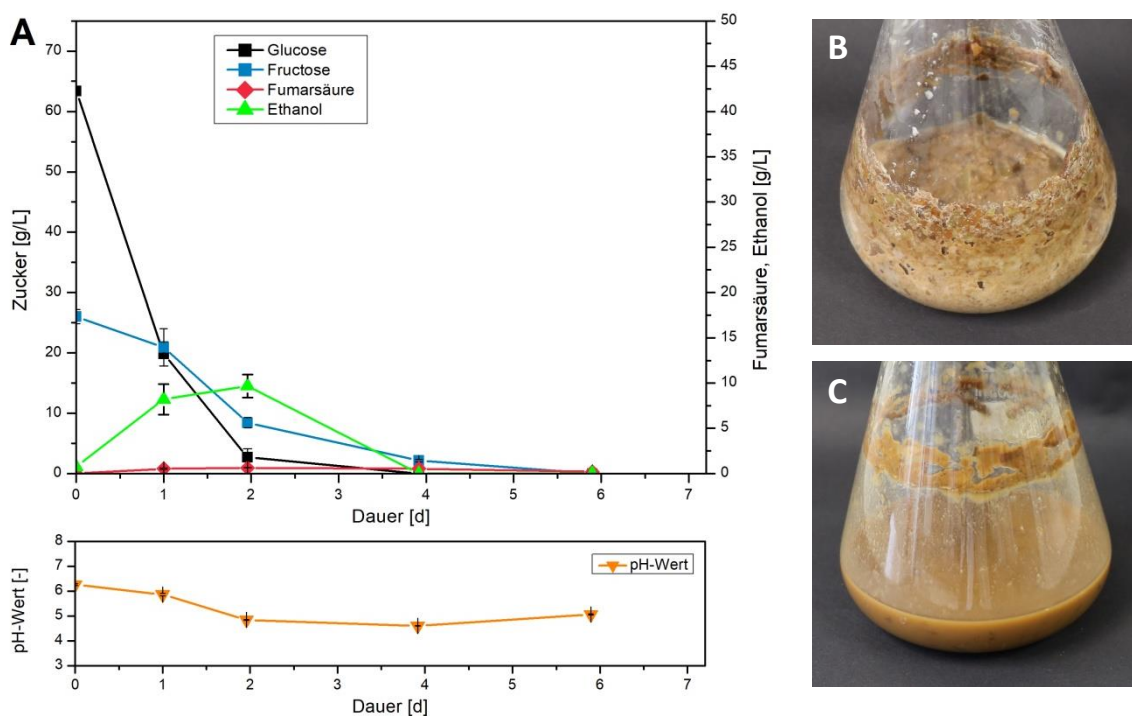


Abbildung 4.57: Simultane Verzuckerung von Apfeltrester mit 1,5 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x und Fermentation mit *R. arrhizus* NRRL 1526 und optimierten Medium C (mit Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und einer Regulierung des pH-Wertes mittels 50 g/L CaCO_3 ; A - Kultivierungsverlauf, B - Aufnahme des Schüttelkolbens nach 0 d, C - Aufnahme nach 4 d.

Analog zum vorherigen SSF-Prozess konnte auch bei diesem Ansatz ein deutlicher Abbau des Apfeltresters beobachtet werden (vgl. Abbildung 4.57, B und C). Dabei zeigte die Morphologie von

R. arrhizus NRRL 1526 über den untersuchten Kultivierungszeitraum ebenfalls keine Auffälligkeiten auf. So wurde, trotz des Einsatzes von zusätzlichem Ammonium und Phosphat (Bestandteil von Medium C), kein übermäßiges Wachstum oder die Bildung von Klumpen beobachtet. Durch den Eintrag von zusätzlicher Glucose mittels Medium C lag zu Beginn der Kultivierung eine erhöhte initiale Konzentration von 63,4 g/L vor. Diese wurde innerhalb der ersten beiden Tage fast vollständig abgebaut. Zusätzlich wies die Kultivierung bereits innerhalb der ersten 24 h eine einsetzende Verstoffwechslung von Fructose auf, die ausschließlich durch den Einsatz von Apfeltrester in das Kultivierungssystem eingetragen wurde. Nach 4 d bzw. 6 d konnte der vollständige Verbrauch von Glucose bzw. Fructose festgestellt werden.

Trotz der hier aufgezeigten Verstoffwechslung dieser beiden Monosaccharide konnte im Vergleich zum vorherigen SSF-Prozess keine gesteigerte Produktion an Fumarsäure nachgewiesen werden. Vielmehr wies das Kultivierungssystem nach einer Dauer von 2 d und einer Konzentration von 0,6 g/L Fumarsäure einen geringeren Endtiter auf. Im Gegensatz hierzu konnte eine gesteigerte Bildung von Ethanol detektiert werden, die nach 2 d eine maximale Konzentration von 9,7 g/L erreichte. In diesem Zusammenhang können für die erhöhte Akkumulation an Ethanol drei mögliche Ursachen angeführt werden. So führt zum einen die Verwendung von Apfeltrester zu einer hohen initialen Viskosität, die die Sauerstoffversorgung von *R. arrhizus* NRRL 1526 im Kultivierungsansatz verringert. Auch der Einsatz von Calciumcarbonat, das bis zum Abreagieren in Form von Feststoff vorlag, verursacht prinzipiell eine Erhöhung der Viskosität. Als dritte mögliche Ursache kann eine weitere Zunahme der Biomasse angeführt werden, die unter den hier vorliegenden Bedingungen prinzipiell möglich ist und aufgrund des daraus resultierenden hohen Sauerstoffbedarfs zur Bildung von Ethanol geführt haben könnte.

Zusammenfassend konnte bei den hier untersuchten SSF-Prozessen zwar eine vollständige Verstoffwechslung der vorliegenden Monosaccharide durch den verwendeten Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 festgestellt werden. Ergänzend hierzu deutete eine deutliche Verflüssigung der Kultivierungsansätze auf eine enzymatische Zersetzung des Apfeltresterfeststoffs hin, die eine Nutzung der strukturell gebundenen Polysaccharide ermöglichte. Allerdings konnte unter Verwendung der hier getesteten Bedingungen keine zufriedenstellende Produktion von Fumarsäure erzielt werden. So wurde mittels SSF-Prozessführung eine maximale Konzentration von lediglich 2,5 g/L Fumarsäure erreicht. Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Prozessführung mittels SSF nicht weiter untersucht. Stattdessen wurde im Folgenden ein alternativer Ansatz untersucht, der die Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfeltrester beinhaltete und somit Kultivierungen ohne das Vorliegen von Feststoffbestandteilen des Apfeltresters ermöglichte.

4.3.3 Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfeltrester

Da beim Vorliegen von Feststoffbestandteilen des Apfeltresters und unter Anwendung einer SSF-Prozessstrategie keine effektive Produktion von Fumarsäure erzielt werden konnte, wurde im Folgenden der Einsatz einer alternativen Prozessführung untersucht. Hierzu wurde auf Basis von Apfeltrester zunächst eine zuckerhaltige Flüssigkeit hergestellt, die keine festen Bestandteile von Apfeltrester mehr enthielt. Die in der Flüssigkeit enthaltenen Monosaccharide wurden anschließend in einer separaten Fermentation mittels *R. arrhizus* NRRL 1526 zu Fumarsäure umgesetzt.

Da bei der Herstellung der zuckerhaltigen Flüssigkeit prinzipiell der Einsatz von verschiedenen Prozessstrategien denkbar ist, wurden insgesamt drei unterschiedliche Ansätze untersucht und zu jeder Prozessstrategie eine Bilanzierung der Wirtschaftlichkeit durchgeführt. Als Bezugsgröße diente hierbei die Functional Unit von 1 kg Gesamtzucker, die in gelöster Form vorliegen. Außerdem wurde bei allen untersuchten Prozessvarianten eine Gesamtkonzentration von 100 - 130 g/L Zuckern vorausgesetzt, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Strategien zu gewährleisten. Eine ausführliche Beschreibung des Bilanzierungsmodells befindet sich in Kapitel 3.2.3. Neben der Identifizierung von spezifischen Vor- und Nachteilen konnte auf Grundlage dieser Bilanzierung der unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten vielversprechendste Ansatz festgelegt werden, der für eine biotechnologische Produktion von Fumarsäure verwendet wird. Einschränkend ist hierbei zu erwähnen, dass alle Untersuchungen ausschließlich im Labormaßstab durchgeführt wurden. Potenziell auftretende Effekte bei einer Übertragung in einen industriell relevanten Maßstab wurden somit nicht berücksichtigt. Außerdem beruhen die Kostenberechnungen auf vereinfachenden Modellannahmen, die nur eingeschränkt die real anfallenden Kosten widerspiegeln.

4.3.3.1 Zusätzliches Auspressen von Apfeltrester

Der von riha WeserGold bereitgestellte Apfeltrester wies eine Restfeuchte von 73,4 % (s. Kapitel 4.3.1.1) auf und enthielt somit noch einen hohen Anteil an wasserlöslichen Zuckern. Zur Separierung dieser Zucker vom Apfeltresterfeststoff wurde eine zusätzliche Pressung durchgeführt. Hierzu wurde im Labormaßstab die hydraulische Packpresse HP-2 H verwendet. Um beim Auspressen von Apfeltrester den Einfluss des eingesetzten Pressdrucks zu untersuchen, wurden Pressungen bei einem moderaten Druck von 20 bar und einem erhöhten Druck von 100 bar durchgeführt. Die dabei erzielten Pressverläufe sind in Abhängigkeit der Dauer vergleichend in Abbildung 4.58 dargestellt.

Das Ergebnis der Pressung zeigt, dass auf Basis des feuchten Apfeltresters prinzipiell noch eine weitere Abtrennung von Flüssigkeit möglich war. So wurde unabhängig vom Pressdruck eine Sättigungskurve aufgezeichnet, die nach einer Dauer von 30 min die Separierung von 0,31 kg/kg_{AT} Presssaft ermöglichte. Dabei konnte innerhalb der ersten Minuten eine deutliche Zunahme festgestellt werden, die im weiteren Verlauf rückläufig war. Bezogen auf die unterschiedlichen Pressdrücke konnte beim Einsatz von 20 bar im Bereich von 2 - 20 min eine erhöhte Pressausbeute im Vergleich zur Pressung mit 100 bar erzielt werden.

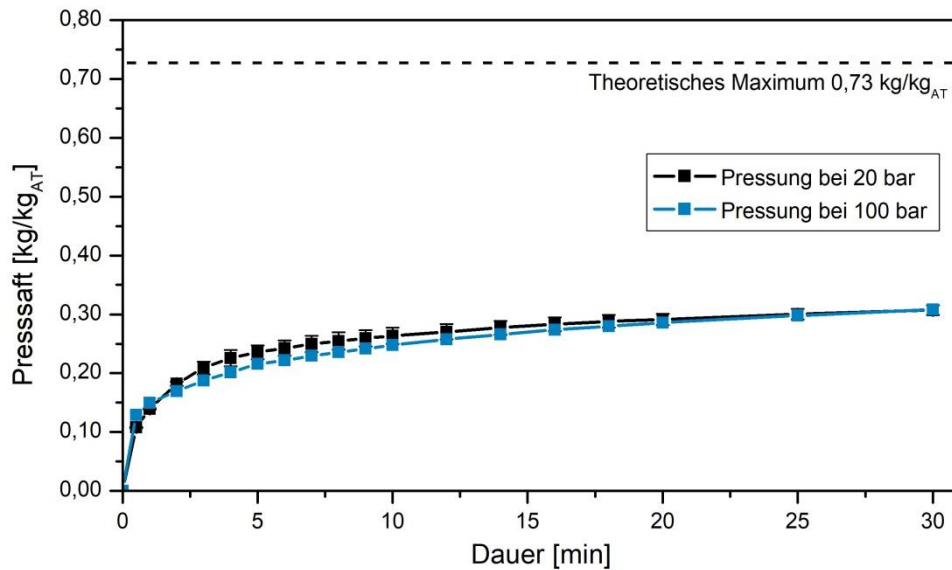


Abbildung 4.58: Zusätzliches Auspressen von 500 g Apfeltrester mittels HP-2 H bei einem Pressdruck von 20 bzw. 100 bar.

Als Grund für diese Beobachtung können zwei entgegengesetzte Effekte beim Pressen von Biomasse angeführt werden. So hängt der Erfolg einer Pressung zum einen von der Anzahl an zerstörten Zellen ab, die mit zunehmendem Prozessdruck steigt. Zum anderen spielt die Ausbildung von Drainagekanälen innerhalb des Presskuchens eine entscheidende Rolle, da diese ein Abfließen des freigesetzten Presssafts ermöglichen. Dabei wird durch einen hohen Prozessdruck der vorliegende Apfeltrester stärker komprimiert und somit einer effektiven Abtrennung der Flüssigkeit entgegengewirkt (Schobinger et al., 2001). Der dadurch erforderliche Kompromiss zwischen ausreichender Zerstörung von Zellen und Aufrechterhaltung des Drainagerüsts war bei einem Pressdruck von 20 bar gegeben. Eine weitere Erhöhung des Pressdrucks auf 100 bar war daher nicht notwendig. Allgemein ist zu beachten, dass der Betriebsdruck nur einen Parameter darstellt, der den Erfolg von Pressungen beeinflusst. Weitere Einflussfaktoren wie beispielsweise die Art und der Maßstab der eingesetzten Presse oder der Zerkleinerungsgrad des Pressguts haben ebenfalls eine entscheidende Rolle beim Pressen von Biomasse (Beltmann und Pilnik, 1971). Daher ist ein direkter Vergleich der hier erzielten Pressung mit Literaturangaben nur eingeschränkt möglich. Allgemein handelt es sich bei einem Pressdruck von 20 bar um einen durchaus üblichen Druck, der auch im industriellen Maßstab angewendet wird (Schobinger et al., 2001).

Hinsichtlich einer vollständigen Bilanzierung der Pressung bei 20 bar wurde nach 20 min eine Separierung von 0,29 kg/kg_{AT} Presssaft erzielt. Bezogen auf die theoretisch enthaltene Menge an Restfeuchte entspricht dies einer Pressausbeute von 40 %. Außerdem konnte zu diesem Zeitpunkt eine Gesamtkonzentration von 110,1 g/L Zucker im Presssaft nachgewiesen werden. Die exakte Zusammensetzung der unterschiedlichen Saccharide ist Abbildung 4.59, A dargestellt. Dabei weist die zuckerhaltige Flüssigkeit bezogen auf Fructose mit 65,0 g/L den größten Anteil auf, gefolgt von Glucose mit einer Konzentration von 36,3 g/L. Unter Berücksichtigung der Gesamtkonzentration an Zuckern und der experimentell bestimmten Dichte der zuckerhaltigen Flüssigkeit von 1062,9 g/L konnte die in Abbildung 4.59, B dargestellte Gesamtausbeute berechnet werden.

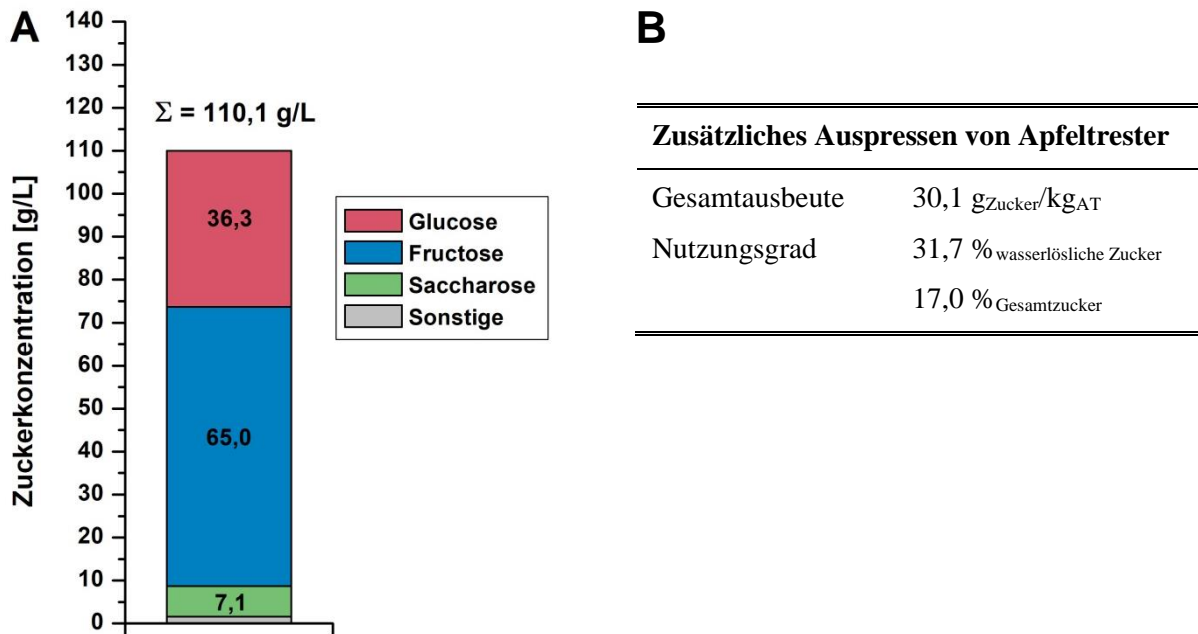


Abbildung 4.59: Zusätzliches Auspressen von Apfeltrester mittels HP-2 H bei einem Pressdruck von 20 bar über 20 min; A - Zuckerzusammensetzung des erhaltenen Presssafts, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.

Insgesamt konnte bei der hier angewendeten Pressung (20 bar, über 20 min) eine Gesamtausbeute von 30,1 g_{Zucker}/kg_{AT} erzielt werden. Dies entspricht einem Nutzungsgrad von 31,7 %, bezogen auf die Fraktion der wasserlöslichen Zucker, die in feuchtem Apfeltrester enthalten sind. Werden außerdem noch strukturell gebundene Polysaccharide berücksichtigt, die durch die hier angewendete Prozessstrategie nicht in die zuckerhaltige Flüssigkeit überführt werden konnten, folgt daraus ein absoluter Nutzungsgrad von 17,0 %. Um dieses Ergebnis mit später diskutierten Prozessstrategien vergleichen zu können, wurden alle relevanten Prozessparameter auf die Functional Unit von 1 kg_{Zucker} bezogen. Somit zeigt Abbildung 4.60 den Prozessaufwand, der zur Herstellung von 1 kg_{Zucker} auf Basis von Apfeltrester investiert werden muss. Die Verwendung des in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Bilanzierungsmodells ermöglichte außerdem eine wirtschaftliche Abschätzung der Gesamtkosten zur Produktion einer Functional Unit.

Aufgrund der simplen Prozessführung bei dieser Herstellungsstrategie setzten sich die Prozesskosten nur aus der Bereitstellung der entsprechenden Menge an Apfeltrester und dem zu investierenden Pressaufwand zusammen. So wurde unter Berücksichtigung der Gesamtausbeute zur Herstellung von 1 kg_{Zucker} eine Menge von 33,3 kg feuchter Apfeltrester benötigt. Der Energiebedarf bei der Pressung dieser Menge an Apfeltrester betrug 0,33 kWh. Die daraus resultierenden Produktionskosten ergaben einen Preis von 1,38 €/kg_{Zucker}, wobei die Bereitstellung der benötigten Menge an Apfeltrester mit 96 %, bezogen auf die Gesamtkosten, den größten Anteil ausmachten.

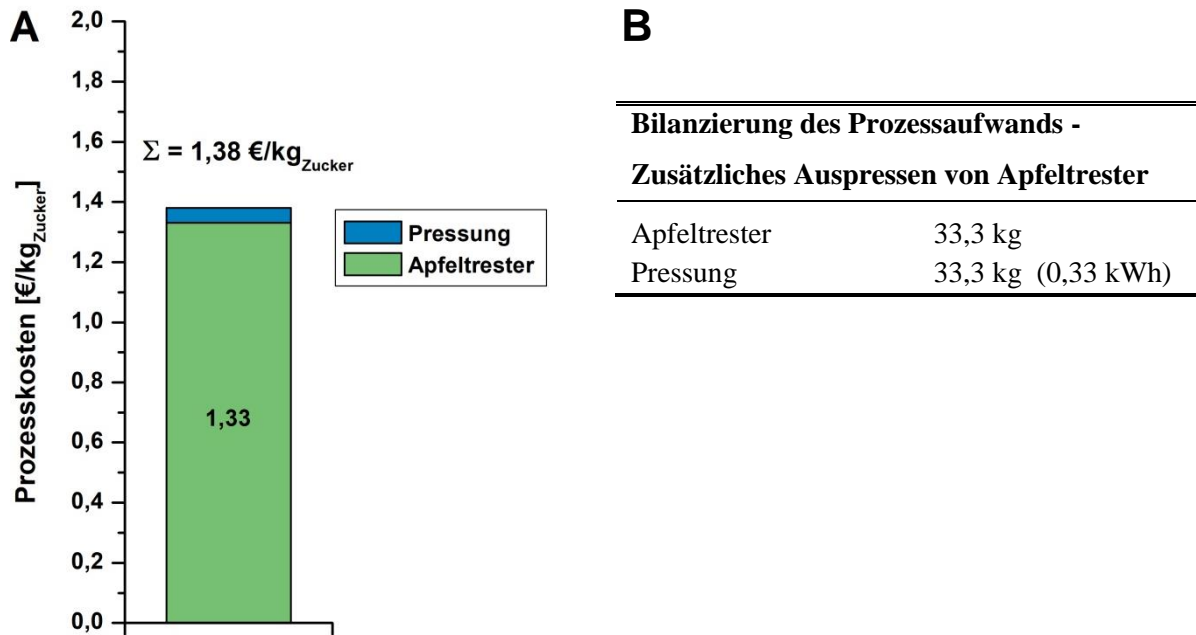


Abbildung 4.60: Bilanzierung des zusätzlichen Auspressens von Apfeltrester mittels HP-2 H bei einem Pressdruck von 20 bar über 20 min; A - Prozesskosten bezogen auf die Functional Unit von 1 kg_{Zucker}, B - Tabellarische Übersicht des Prozessaufwands zur Herstellung von 1 kg_{Zucker}.

Zusammenfassend konnte mit der Prozessstrategie des zusätzlichen Auspressens bei 20 bar eine einfache Variante zur Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfeltrester aufgezeigt werden. Im Vergleich zu später diskutierten Prozessvarianten (s. Kapitel 4.3.3.2 - 4.3.3.4) kann vor allem der geringe Prozessaufwand als vorteilhaft angeführt werden. So wies der abgetrennte Presssaft bereits eine Zuckerkonzentration von 110 g/L auf. Eine zusätzliche Aufkonzentrierung der Flüssigkeit, die sich negativ auf die Prozesskosten auswirkt, war somit nicht notwendig. Als nachteilig stellt sich dagegen der geringe Nutzungsgrad von ausschließlich bereits gelösten Zuckern dar, der in einem hohen Bedarf an Apfeltrester resultierte.

4.3.3.2 Dreistufige Extraktion mit Wasser

Als zweite Prozessstrategie zur Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfeltrester wurde eine Extraktion der wasserlöslichen Zucker mittels Wasser untersucht. Hierzu wurde dem feuchten Apfeltrester eine definierte Menge an Wasser hinzugegeben. In diesem Zusammenhang konnte in Vorversuchen ein ideales Extraktionsverhältnis von 2/1 (w/w, Apfeltrester/Wasser) festgelegt werden. Nach der Durchmischung des Ansatzes wurde zur Separierung der zuckerhaltigen Flüssigkeit eine Pressung mittels HP-2 H Presse bei 20 bar durchgeführt. Die Pressung erfolgte bis zur Abtrennung der ursprünglich hinzugegebenen Menge an Wasser. Um einen möglichst großen Anteil an wasserlöslichen Zucker zu separieren, wurde dieser Extraktionsprozess insgesamt dreimal wiederholt. Die dabei erzielten Zuckerkonzentrationen der jeweiligen Extrakte sind in Abbildung 4.61 vergleichend dargestellt.

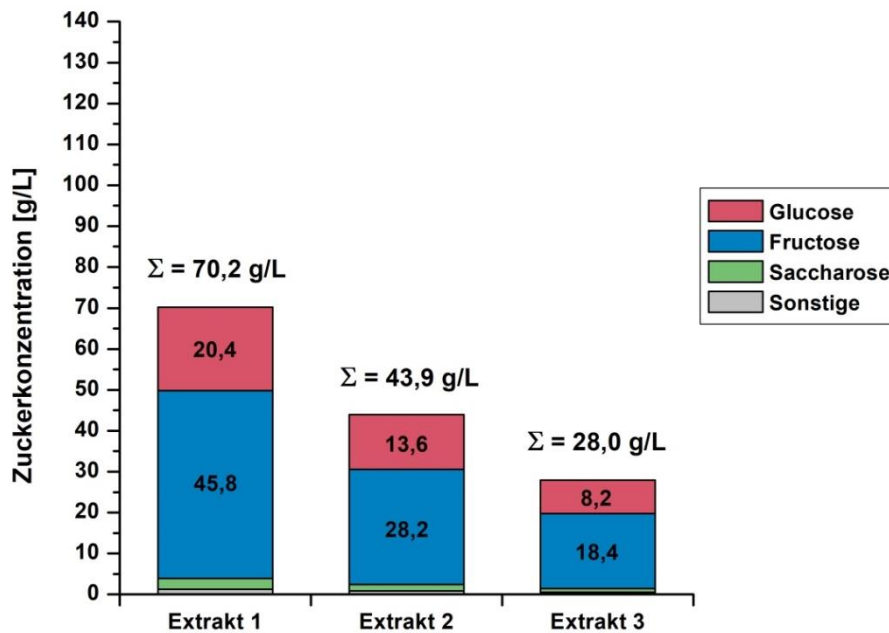


Abbildung 4.61: Zuckerkonzentration der Extrakte bei dreistufiger Extraktion von Apfeltrester mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) und anschließender Separierung mittels HP-2 H Presse (20 bar).

Durch die Zugabe von Wasser wurde der Anteil an wasserlöslichen Zuckern im Apfeltrester reduziert. Dadurch konnte, im Vergleich zum ausschließlichen Abpressen (vgl. Kapitel 4.3.3.1), eine geringe Zuckerkonzentration von 70,2 g/L in Extrakt 1 detektiert werden. Diese Feststellung kann ebenfalls auf die darauf folgenden Extraktionsschritte übertragen werden. So wurde aufgrund einer zunehmenden Abtrennung der wasserlöslichen Zucker eine geringere Zuckerkonzentration in Extrakt 2 (43,9 g/L) und Extrakt 3 (28,0 g/L) festgestellt. Anzumerken ist hierbei, dass trotz unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen das relative Verhältnis der einzelnen Saccharide konstant war. So wurde in allen Extrakten ein Anteil von 65 % Fructose und 30 % Glucose nachgewiesen.

Da bei den drei hergestellten Extrakten die Zuckerkonzentration unterhalb der erforderlichen Konzentration von mindestens 100 g/L lag, war eine zusätzliche Aufkonzentrierung der Extrakte notwendig. Hierzu wurden die Extrakte separat voneinander in einem offenen System auf eine Temperatur von ca. 90 °C erhitzt und somit der Wasseranteil durch Verdampfen reduziert. Anschließend wurden die drei dadurch erhaltenen Konzentrate vereinigt und die Zuckerkonzentration mittels HPAEC-PAD-Analyse bestimmt (s. Abbildung 4.62, A). Zusätzlich enthält Abbildung 4.62, B die dabei erzielte Gesamtausbeute, bezogen auf die eingesetzte Menge an Apfeltrester.

Nach der Aufkonzentrierung und Vereinigung der drei Ansätze konnte im daraus resultierenden Konzentrat eine Gesamtkonzentration von 123,4 g/L Zucker nachgewiesen werden. Die anteilige Zusammensetzung der einzelnen Zucker lieferte hierbei ein vergleichbares Ergebnis gegenüber dem Zuckerverhältnis vor der Aufkonzentrierung. Somit stellt die Verdunstung von Wasser bei einer Temperatur von ca. 90 °C im Labormaßstab eine simple Möglichkeit dar, um den Zuckeranteil in gering konzentrierten Flüssigkeiten zu erhöhen. Bezogen auf die Gesamtausbeute konnten bei der hier gezeigten Prozessstrategie insgesamt 70,4 g_{Zucker}/kg_{AT} in die zuckerhaltige Flüssigkeit überführt werden. Dies entspricht einem Nutzungsgrad von 74,2 %, bezogen auf die Fraktion der wasserlöslichen Zucker. Unter Berücksichtigung aller in Apfeltrester enthaltenen Zucker konnten 39,8 % der Zucker in die Flüssigphase überführt und somit vom Restfeststoff separiert werden.

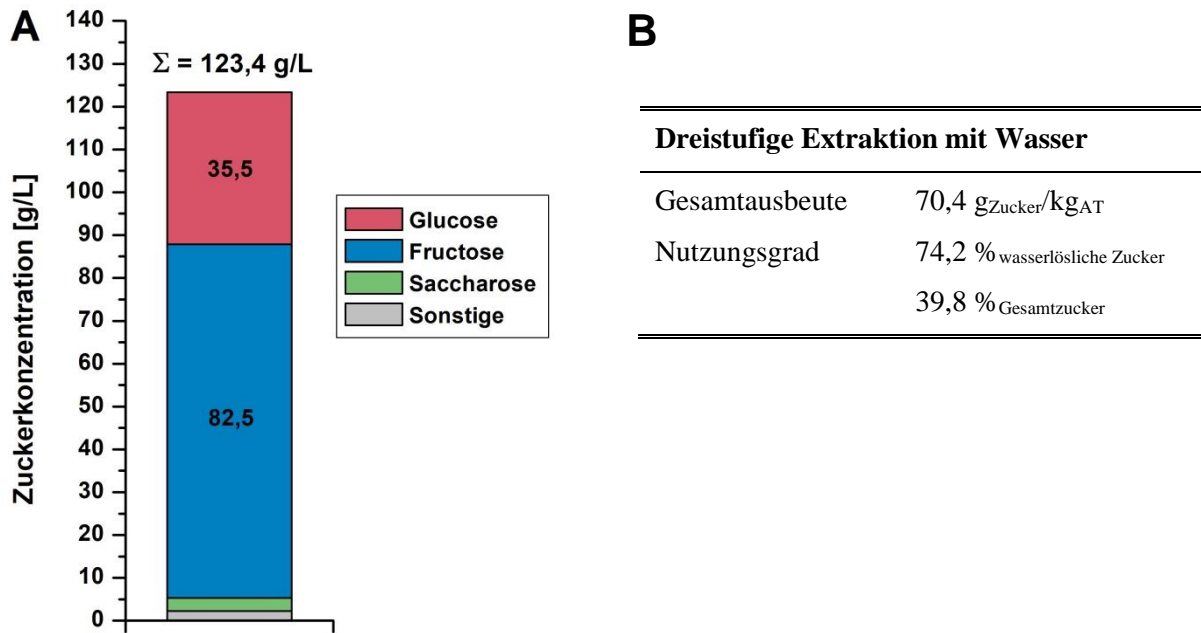


Abbildung 4.62: Dreistufige Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) von Apfeltrester und anschließender Separierung mittels HP-2 H Presse (20 bar); A - Zuckerzusammensetzung des aufkonzentrierten und vereinigten Konzentrats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.

Im Vergleich zur Strategie des zusätzlichen Auspressens von Apfeltrester (s. Kapitel 4.3.3.1) stellt dieses Ergebnis eine Steigerung von ca. 230 % dar. Allerdings musste zum Erreichen dieses Nutzungsgrads ein deutlich erhöhter Prozessaufwand betrieben werden. Beispiele hierfür sind das dreimalige Pressen des mit Wasser versetzten Apfeltresters oder die notwendige Aufkonzentrierung der Extrakte. Um bei einem Vergleich auch diese Prozessparameter zu berücksichtigen, wurde das Bilanzierungsmodell um die entsprechenden Parameter erweitert und die daraus resultierende Kostenberechnung in Abbildung 4.63 graphisch dargestellt. Da bei der Prozessstrategie der Extraktion mit Wasser prinzipiell auch ein Einsatz von weniger Extraktionsstufen denkbar ist, wurden auf Grundlage des hier gezeigten Versuchs ebenfalls Kostenberechnungen für eine ein- bzw. zweistufige Extraktion angefertigt. Ergänzend zu Abbildung 4.63 sind alle für die Bilanzierung relevanten Prozessgrößen in Tabelle 4.8 vergleichend dargestellt.

Ein Vergleich der Bilanzierungsergebnisse zeigt bei einer Zunahme der Extraktionsschritte eine Abnahme der Prozesskosten zur Gewinnung von 1 kg_{Zucker} auf. So wurden bei der einstufigen Extraktion die höchsten Prozesskosten von 2,00 €/kg_{Zucker} berechnet. Mit 1,52 bzw. 1,50 €/kg_{Zucker} wies die zwei- bzw. dreistufige Extraktion geringere Kosten auf. Bei einer genauen Betrachtung der einzelnen Prozessparameter konnten zwei gegenläufige Tendenzen mit zunehmender Anzahl an Extraktionsstufen festgestellt werden. So sinkt aufgrund eines verbesserten Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen wasserlöslichen Zucker die benötigte Menge an Apfeltrester (s. Tabelle 4.8). Dies resultiert in einer Abnahme der Kosten, die für die Bereitstellung der entsprechenden Menge an Apfeltrester benötigt werden. Da allerdings mit jeder weiteren Extraktionsstufe geringere Zuckerkonzentrationen im entsprechenden Extrakt erzielt wurden, musste ein verhältnismäßig höherer Prozessaufwand zur Aufkonzentrierung investiert werden.

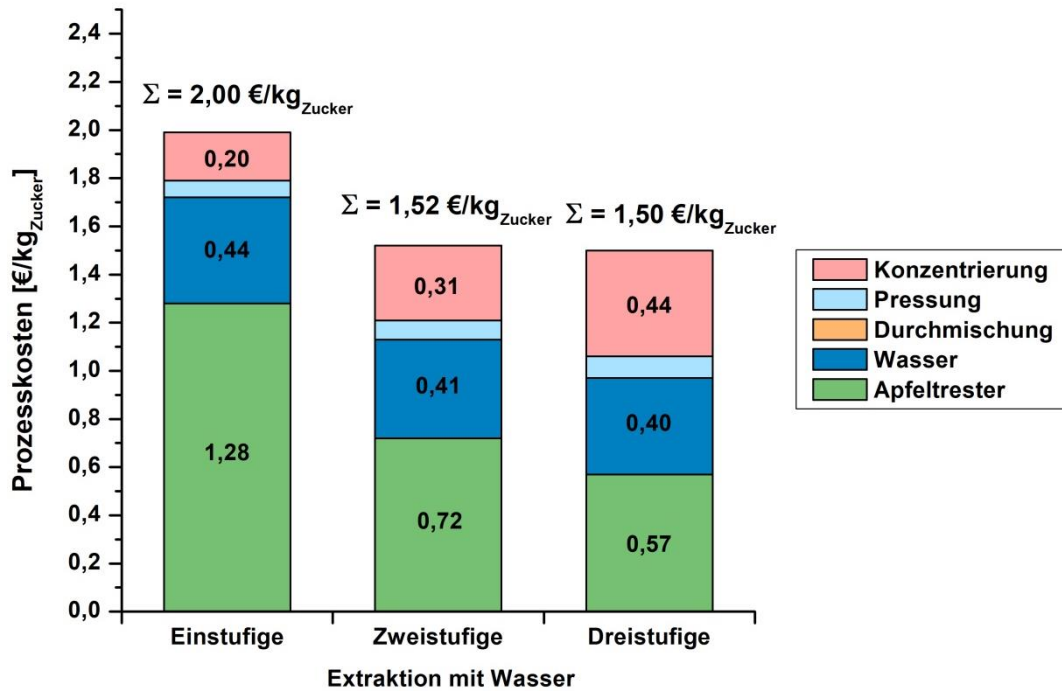


Abbildung 4.63: Bilanzierung der mehrstufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) von Apfeltrester; Prozesskosten bezogen auf die Functional Unit von 1 kg_{Zucker}.

Tabelle 4.8: Übersicht des Prozessaufwands zur Herstellung von 1 kg_{Zucker} auf Grundlage der mehrstufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) von Apfeltrester.

Bilanzierung des Prozessaufwands - Mehrstufige Extraktion mit Wasser				
	Einstufig	Zweistufig	Dreistufig	
Apfeltrester	33,1 kg	18,1 kg	14,2 kg	
Wasser	11,1 kg	10,2 kg	10,1 kg	
Durchmischung	20 min	40 min	60 min	
	(0,0003 kWh)	(0,0004 kWh)	(0,0006 kWh)	
Pressung	48,1 kg	53,6 kg	62,8 kg	
	(0,48 kWh)	(0,54 kWh)	(0,63 kWh)	
Konzentrierung	5,0 kg _{Wasser}	7,7 kg _{Wasser}	10,8 kg _{Wasser}	
	(1,34 kWh)	(2,08 kWh)	(2,91 kWh)	

Als Beispiel für diese Aussage können die Prozesskosten der zwei- und dreistufigen Extraktion miteinander verglichen werden. Hierbei zeigt die zweistufige Extraktion mit Wasser im Vergleich zur dreistufigen Prozessführung einen um 27 % erhöhten Kostenanteil für die Bereitstellung der benötigten Menge an Apfeltrester. Dagegen fallen bei der zweistufigen Extraktion, aufgrund des geringeren Prozessaufwands, beim Aufkonzentrieren 30 % weniger Prozesskosten an. Bezogen auf die absolute Menge an Wasser, die für die Extraktion benötigt wird, wurden nur geringe Abweichungen festgestellt. Als Ursache hierfür kann die Wassermenge angeführt werden, die während der Aufkonzentrierung verdunstet und über eine integrierte Kondensation dem System zurückgeführt wird. Unter Berücksichtigung dieser Wassermengen zeigt der absolute Verbrauch an Wasser mit 10,1 - 11,1 kg_{Wasser}/kg_{Zucker} relativ konstante Werte auf, die nur geringfügige Unterschiede bei der Kostenbilanzierung verursachen.

Insgesamt konnte bei der dreistufigen Extraktion mit einem jeweiligen Extraktionsverhältnis von 2/1 (w/w, Apfeltrester/Wasser) die wirtschaftlich günstigste Prozessvariante identifiziert werden. Vor allem der hohe Nutzungsgrad von 74,2 %, bezogen auf die in Apfeltrester enthaltenen Zucker, wirkte sich positiv auf die Bilanzierung aus. Da bei dieser Prozessstrategie allerdings ein verhältnismäßig hoher Prozessaufwand zur Herstellung der zuckerhalten Flüssigkeit notwendig ist, summieren sich die Gesamtkosten auf einen Wert von 1,50 €/kg_{Zucker}. Im Vergleich zur Prozessstrategie des zusätzlichen Auspressens von Apfeltrester konnte somit keine Senkung der Herstellungskosten erreicht werden (vgl. Kapitel 4.3.3.1). Vielmehr stellt das hier erzielte Ergebnis eine Kostensteigerung um 9 % dar.

4.3.3.3 Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester

Als dritte Prozessstrategie wurde zur Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit eine enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester untersucht. Neben der Nutzung von wasserlöslichen Zuckern ermöglichte dieser Ansatz auch eine Monomerisierung und Überführung der strukturell gebundenen Polysaccharide in die Flüssigphase.

Analog zu SSF-Versuchen (s. Kapitel 4.3.2) wurde zur Monomerisierung der Cellulose und Hemicellulose das Enzympräparat Biogazyme 2x verwendet. Dabei ist prinzipiell zu beachten, dass die in Biogazyme 2x enthaltenen Cellulasen und Hemicellulasen eine Produktinhibierung aufweisen. Das heißt, mit einer fortschreitenden Freisetzung an Monosacchariden kann theoretisch eine rückläufige Aktivität der Enzyme erwartet werden (Xiao et al., 2004). Da Apfeltrester bereits monomer vorliegende Glucose und Fructose enthält, kann daher bereits zu Beginn der enzymatischen Hydrolyse von einer reduzierten Enzymaktivität ausgegangen werden. Um diese Aussage für das Enzympräparat Biogazyme 2x zu überprüfen, wurde der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an Glucose bzw. Fructose auf die Cellulaseaktivität unter optimalen Reaktionsbedingungen (50 °C und pH 4,8) untersucht. Die dabei erzielten Aktivitäten (FPU nach Ghose, 1987) wurden normiert und in Abbildung 4.64, A und B dargestellt.

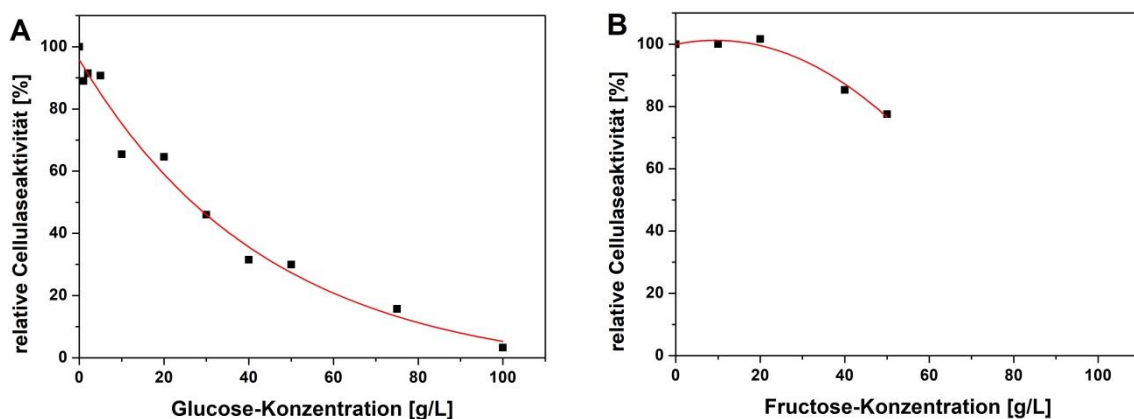


Abbildung 4.64: Einfluss der Glucose- und Fructosekonzentration auf die Cellulaseaktivität von Biogazyme 2x, bei 50 °C und pH 4,8; A - Inhibition durch Glucose, B - Inhibition durch Fructose.

Bezogen auf das Monosaccharid der Cellulose konnte mit zunehmenden Konzentrationen an Glucose ein deutlicher Rückgang der Cellulaseaktivität festgestellt werden. So verursachte, unter Zuhilfenahme der gezeigten Fitfunktion, bereits eine Glucosekonzentration von 10 g/L eine Abnahme der Cellulaseaktivität auf ca. 75 % der ursprünglichen Aktivität. Dabei entsprechen 10 g/L Glucose der

Menge an Glucose, die bei einem Feststoffanteil von 10 % (w/w) Apfeltrester bereits als wasserlösliche Monosaccharide enthalten sind (vgl. Kapitel 4.3.1.3). Wird dagegen bei einem Hydrolyseansatz ein Feststoffanteil von 20 % (w/w) Apfeltrester verwendet, entspricht dies einer Glucosekonzentration von 20 g/L, die bereits zu Beginn der Reaktion als gelöste Monosaccharide vorliegen. Dies resultiert in einem theoretischen Rückgang der Cellulaseaktivität auf 60 %. Somit kann aufgrund der in Apfeltrester enthaltenen wasserlöslichen Glucose bereits zu Reaktionsbeginn von einer negativen Beeinflussung der Aktivität von Biogazyme 2x ausgegangen werden. Es ist weiter zu erwarten, dass eine zusätzliche Freisetzung von Glucose während der Hydrolyse diese Tendenz verstärkt. Im Gegensatz zu Glucose ist Fructose nicht strukturell in Apfeltrester gebunden. Somit liegt die gesamte Menge an Fructose bereits zu Beginn in gelöster Form vor. In diesem Zusammenhang lieferte die Bestimmung der relativen Cellulaseaktivität von Biogazyme 2x bis zu einer Konzentration von 20 g/L Fructose keine Abnahme der Aktivität. Somit kann, bezogen auf die bei einem Feststoffanteil von 10 % (w/w) Apfeltrester eingetragene Menge an Fructose (21 g/L), von keiner negativen Beeinträchtigung der Enzymaktivität ausgegangen werden. Erst bei Konzentrationen von > 20 g/L Fructose wurde ein Rückgang der Cellulaseaktivität detektiert. So verursachte beispielsweise eine Konzentration von 42 g/L Fructose, die bei einem Feststoffanteil an Apfeltrester von 20 % (w/w) in den Hydrolyseansatz eingetragen wird, einen Rückgang der Aktivität auf 87 %. Im Vergleich zu Glucose liegt somit eine deutlich geringere Einflussnahme bei diesem Monosaccharid vor.

Enzymatische Hydrolyse mit Feed-Strategie und 6,0 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x

Um trotz dieser negativen Beeinflussung der Enzymaktivität eine ausreichende Monomerisierung der strukturellen Polysaccharide zu gewährleisten, wurde bei der enzymatischen Hydrolyse eine Feed-Strategie angewendet. Dies beinhaltete sowohl eine gestaffelte Zugabe von Apfeltrester als auch eine gekoppelte Zugabe von Biogazyme 2x. Als Reaktionssystem wurde ein Glasreaktor mit einem Blattrührer verwendet, der bei 50 °C und 50 rpm über insgesamt 4 d betrieben wurde. Zur Pufferung des pH-Wertes wurde ein 500 mM Citrat-Puffer (pH = 4,8) genutzt, der über den gesamten Reaktionszeitraum einen stabilen pH-Wert im Bereich von 4,8 - 4,3 ermöglichte. Zu Beginn der Reaktion wurde ein Feststoffanteil an Apfeltrester von 10 % (w/w) eingesetzt. Neben einer akzeptablen Beeinflussung der Cellulaseaktivität, aufgrund der wasserlöslichen Zucker in Apfeltrester, ermöglichte dieser Feststoffanteil eine gute anfängliche Durchmischung des Ansatzes und somit einen ausreichenden Zugang der Enzyme zum abzubauenen Apfeltrester. Bezogen auf die eingesetzte Anfangskonzentration an Biogazyme 2x wurden 10,0 FPU/g_{BTM} (50 mg_{B2x}/g_{BTM}) verwendet. Dabei handelte es sich um eine Enzymkonzentration, die in verschiedenen Literaturquellen als wirtschaftlich rentabel beschrieben wird (Gregg et al., 1998; Wooley et al., 1999). Nach einer Reaktionszeit von 1 d und einer Abnahme der Viskosität wurde, durch Zugabe von frischem Apfeltrester, der Feststoffanteil auf 15 % (w/w) erhöht. Parallel hierzu wurden außerdem, bezogen auf die hinzugegebene Menge an Apfeltrester, 5,0 FPU/g_{BTM} an Biogazyme 2x hinzugefügt. Nach einem weiteren Tag wurde dieser Feed wiederholt. Damit lag der absolut eingesetzte Feststoffanteil bei 20 % (w/w). Unter Berücksichtigung aller enthaltenen Saccharide ist somit die Herstellung eines Hydrolysats, mit einer theoretischen Zuckerkonzentration von 134 g/L möglich. Die Gesamtkonzentration an Biogazyme 2x betrug hierbei 6,0 FPU/g_{BTM} (30 mg_{B2x}/g_{BTM}). Um den Fortschritt der enzymatischen Hydrolyse qualitativ zu beschreiben, sind in Abbildung 4.65 exemplarische Aufnahmen des Reaktionsansatzes dargestellt.

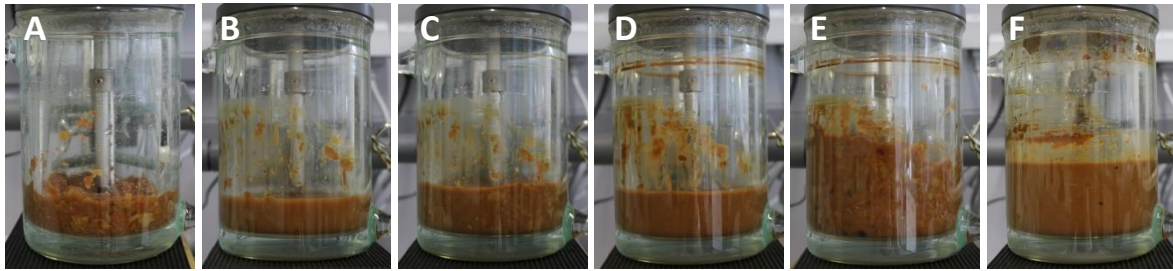


Abbildung 4.65: Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm; A - 10 % (w/w) Feststoff in 500 mM Citrat-Puffer (pH 4,8) und 10,0 FPU/g_{BTM} nach 0 d, B - Reaktionsansatz nach 1 d, C - 15 % (w/w) Feststoff und 7,3 FPU/g_{BTM} nach 1 d, D - Reaktionsansatz nach 2 d, E - 20 % (w/w) Feststoff und 6,0 FPU/g_{BTM} nach 2 d, F - Reaktionsansatz nach 4 d.

Anhand der Abbildung kann eine deutliche Verflüssigung des Reaktionsansatzes belegt werden. So weist der Ansatz zu Beginn und nach der zweimaligen Zugabe von frischem Apfeltrester eine erhöhte Viskosität auf. Außerdem sind Fragmente der Schale und des Fruchtfleischs deutlich erkennbar (s. Abbildung 4.65, A, C und E). Mit fortschreitender Reaktionsdauer wurden diese Strukturen des Apfeltresters abgebaut. Dies resultierte in einer ebenfalls dokumentierten Verflüssigung des Ansatzes und einer damit verknüpften Abnahme der Viskosität (s. Abbildung 4.65, B, D und F).

Um neben der qualitativ nachgewiesenen Hydrolyse auch die Zunahme an Monosacchariden zu quantifizieren, wurde in regelmäßigen Abständen die Zuckerkonzentration in der Flüssigphase bestimmt und in Abbildung 4.66 graphisch dargestellt. Die Abbildung enthält zusätzlich die theoretischen Konzentrationen unter Berücksichtigung der wasserlöslichen bzw. der Summe aus wasserlöslichen und strukturellen Zuckern.

Bezogen auf die Gesamtkonzentration an Zuckern konnte über den gesamten Reaktionsverlauf eine kontinuierliche Zunahme an Monosacchariden beobachtet werden. Dabei zeigten die entsprechenden Zeitpunkte des Apfeltrester-Feeds (nach 1 d und 2 d) einen sprunghaften Anstieg der Zuckerkonzentration auf. Als Ursache für diese Beobachtung und für das Vorliegen einer initialen Konzentration von 38,3 g/L können die in Apfeltrester enthaltenen wasserlöslichen Zucker angeführt werden. Diese liegen bereits in monomerer Form vor und wurden somit ab dem Zeitpunkt der Zugabe von Apfeltrester in der Flüssigphase detektiert. Ergänzend hierzu kann der Konzentrationsverlauf von Fructose angeführt werden, die ausschließlich als wasserlöslicher Zucker in Apfeltrester vorliegt und kein Bestandteil der Cellulose bzw. Hemicellulose ist. Somit ist wie in Abbildung 4.66, C dargestellt nur mit einer sprunghaften Zunahme der Fructosekonzentration, bei einer weiteren Zugabe von Apfeltrester zu rechnen. Während der Hydrolyse wurde dagegen keine weitere Fructose freigesetzt. Bis auf geringe Abweichungen konnte bei diesem Versuch der theoretisch berechnete Verlauf nachgebildet werden. Als mögliche Ursache für die leicht erhöhte, experimentell bestimmte Endkonzentration von 53,6 g/L Fructose, kann eine Aufspaltung von Saccharose angeführt werden. Saccharose, das Dimer aus Glucose und Fructose, ist in geringen Konzentrationen in Apfeltrester enthalten (s. Kapitel 4.3.1.3), konnte allerdings nach einer Reaktionszeit von 4 d nicht in der Flüssigphase nachgewiesen werden.

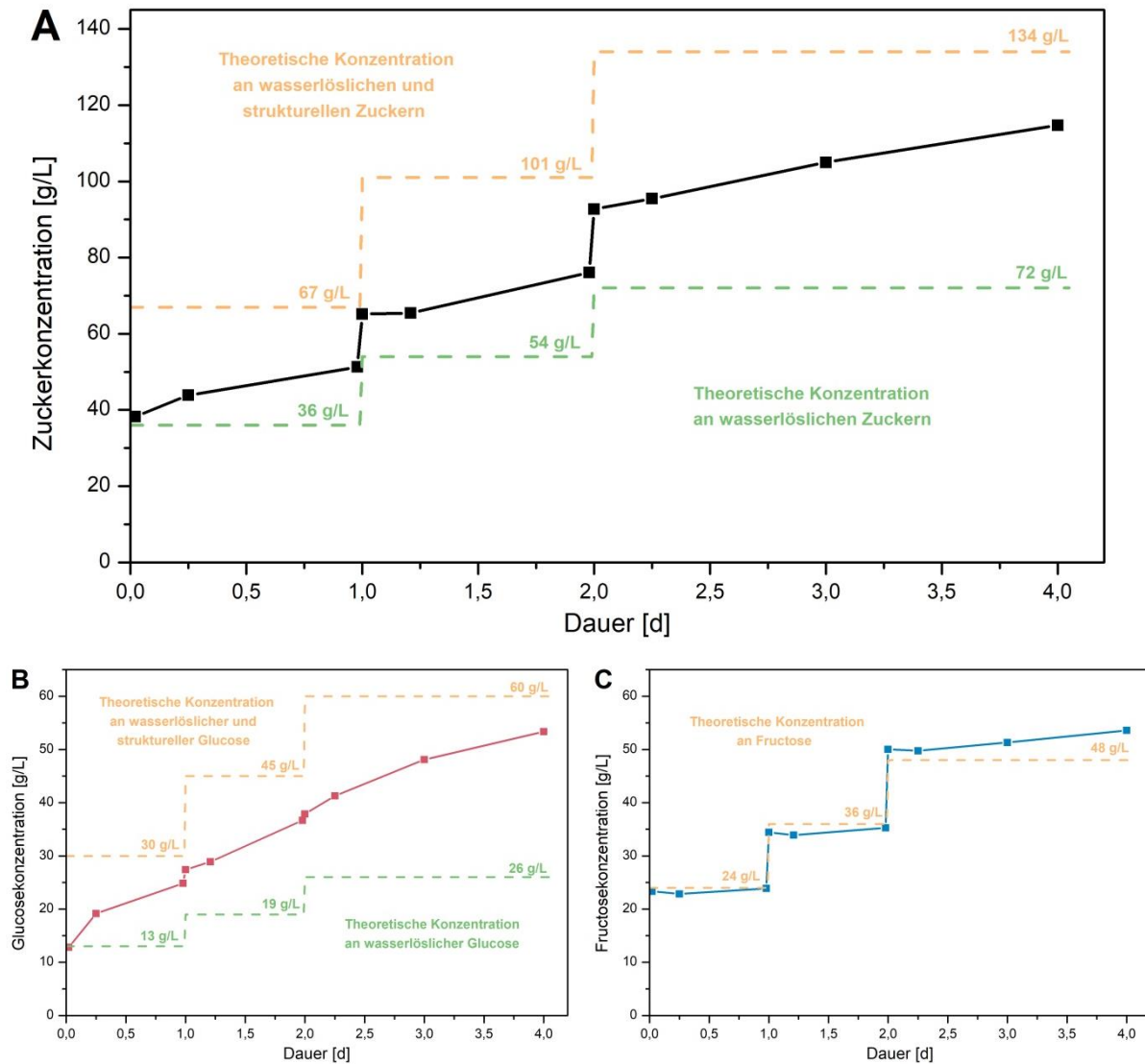


Abbildung 4.66: Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 500 mM Citrat-Puffer und 6,0 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x; A - Verlauf der Konzentration an Gesamtzuckern, B - Verlauf der Glucosekonzentration, C - Verlauf der Fructosekonzentration.

Im Gegensatz zu Fructose ist Glucose auch strukturell in Apfeltrester gebunden. So konnte neben bereits monomer vorliegender Glucose eine deutliche Zunahme während der enzymatischen Hydrolyse festgestellt werden (s. Abbildung 4.66, B). Nach einer Reaktionszeit von 4 d wurde eine Glucosekonzentration von 53,4 g/L detektiert. Dies entspricht einem Monomerisierungsgrad von ca. 80 %, bezogen auf die Menge an polymer vorliegender Glucose. Insgesamt konnte durch die hier angewendete Feed-Strategie eine Zuckerkonzentration von 114,7 g/L erzielt werden. Somit konnten 69 % der in Apfeltrester enthaltenen Polysaccharide monomerisiert werden.

Eine Einordnung dieses Hydrolysegrads in die Literatur ist aufgrund der großen Varianz an Reaktionsparametern nur eingeschränkt möglich. So konnte beispielsweise in Parmar et al. (2013) eine fast vollständige Hydrolyse der in Apfeltrester enthaltenen Cellulose erzielt werden. Hierfür wurde der verwendete Apfeltrester allerdings zusätzlich zerkleinert, mit Schwefelsäure vorbehandelt und ein geringerer Feststoffanteil von 5 % (w/v) für die enzymatische Hydrolyse verwendet. Außerdem wurde mit 0,182 mL_{Enzymmischung}/g_{BTM} eine deutlich erhöhte Menge an Enzymen verwendet. Hinsichtlich eines

wirtschaftlichen Vergleichs ist daher mit deutlich höheren Prozesskosten zu rechnen. Dass eine enzymatische Hydrolyse auch mit einem höheren Feststoffgehalt und ohne eine zusätzliche Vorbehandlung möglich ist, konnte in Magyar et al. (2016) aufgezeigt werden. Dabei ermöglichte die enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit einem Feststoffanteil von 20 % (w/w) die Herstellung eines Hydrolysats mit einer Zuckerkonzentration von ca. 75 g/L Gesamtzucker.

Da der Reaktionsansatz nach der viertägigen enzymatischen Hydrolyse nicht frei von Feststoffpartikeln war, wurden der verbleibende Restfeststoff von der Flüssigphase abgetrennt. Aufgrund der flüssigen Beschaffenheit des Ansatzes war hierbei eine Separierung mit der hydraulischen Packpresse HP-2 H nicht möglich. Deshalb wurde der Reaktionsansatz für 20 min bei 8.500 rpm zentrifugiert und dadurch die zuckerhaltige Flüssigkeit vom Restfeststoff separiert. Unter Berücksichtigung der dabei erzielten Separierungsausbeute von 0,66 kg_{Hydrolysat}/kg_{Reaktionsansatz} konnte die in Abbildung 4.67, B dargestellte Gesamtausbeute erzielt werden.

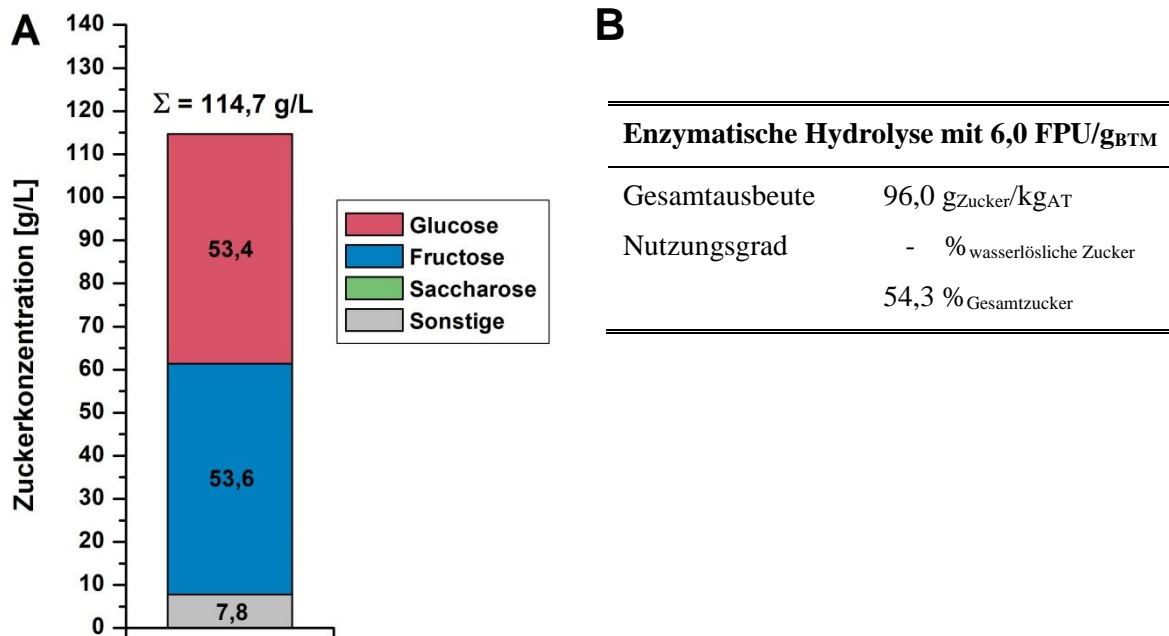


Abbildung 4.67: Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 500 mM Citrat-Puffer und 6,0 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x, anschließende Separierung mittel Zentrifugation bei 8.500 rpm über 20 min; A - Zuckerzusammensetzung des abgetrennten Hydrolysats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.

Das Ergebnis der Berechnungen zeigt, dass 96,0 g_{Zucker}/kg_{AT} in die zuckerhaltige Flüssigkeit überführt werden konnten. Bezogen auf die Gesamtmenge an Sacchariden, die in Apfeltrester enthalten sind, entspricht dies einem Nutzungsgrad von 54,3 %. Somit konnte im Vergleich zur Prozessstrategie des zusätzlichen Auspressens und der dreistufigen Hydrolyse mit Wasser der höchste Nutzungsgrad an enthaltenen Zuckern erzielt werden. Außerdem zeigt die in Abbildung 4.67, A dargestellte Zusammensetzung der einzelnen Monosacchariden einen Glucose- und Fructoseanteil von jeweils 47 % auf. Im Vergleich zu den beiden zuvor untersuchten Herstellungsstrategien stellt dies eine deutliche Steigerung des Anteils an Glucose dar (vgl. Kapitel 4.3.3.1 und 4.3.3.1), der hinsichtlich einer möglichen fermentativen Nutzung positiv bewertet werden kann.

Um auch für diese Prozessstrategie die Gesamtkosten zur Herstellung von 1 kg_{Zucker} abschätzen zu können, wurde das Bilanzierungsmodell um die entsprechenden Parameter erweitert und die daraus resultierende Kostenberechnung in Abbildung 4.68 graphisch dargestellt.

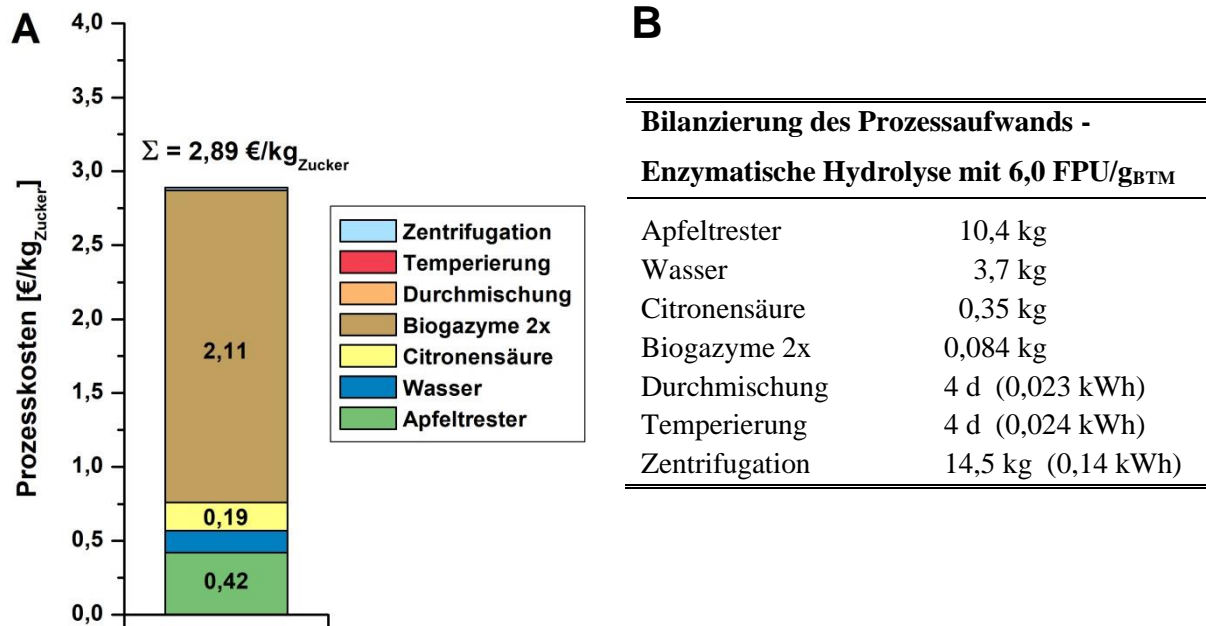


Abbildung 4.68: Bilanzierung der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester mit 6,0 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x und Feed-Strategie; A - Prozesskosten bezogen auf die Functional Unit von 1 kg_{Zucker}, B - Tabellarische Übersicht des Prozessaufwands zur Herstellung von 1 kg_{Zucker}.

Insgesamt belaufen sich die Prozesskosten zur Herstellung von 1 kg_{Zucker} auf 2,89 €. Im Vergleich zu bisher untersuchten Herstellungsstrategien stellt dieses Ergebnis eine deutliche Kostensteigerung dar. Als größter Kostenpunkt kann mit 2,11 €/kg_{Zucker} die Bereitstellung der benötigten Mengen an Biogazyme 2 x angeführt werden. Dagegen wurde aufgrund des hohen Nutzungsgrads an Zuckern eine vergleichsweise geringe Menge an Apfeltrester von 10,4 kg zur Herstellung von 1 kg_{Zucker} in flüssiger Form benötigt. Dies resultierte in niedrigen Kosten von 0,42 €/kg_{Zucker} für die Bereitstellung der benötigten Menge an Apfeltrester. Aus Abbildung 4.68, A wird außerdem ersichtlich, dass bei dem hier verwendeten Bilanzierungsmodell die Durchmischung und Temperierung des Reaktionsansatzes sowie die Separierung der Flüssigphase nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Prozesskosten hatten. Hinsichtlich einer im folgenden Kapitel beschriebenen Optimierung der Prozessstrategie bestand somit bei den Enzymkosten das größte Optimierungspotenzial.

Enzymatische Hydrolyse mit Feed-Strategie und 1,8 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x

Unter Verwendung der zuvor beschriebenen Prozessstrategie wurde eine enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit einer reduzierten Menge an Biogazyme 2x durchgeführt. Die Konzentration an Biogazyme 2x wurde dabei so ausgewählt, dass eine ausreichende Verflüssigung des Reaktionsansatzes realisiert werden konnte, die eine zusätzliche Zugabe von Apfeltrester auf einen finalen Feststoffanteil von 20 % (w/w) ermöglichte. Als weitere Bedingung wurde die Enzymkonzentration so gewählt, dass im Hydrolysat nach einer Reaktionszeit von 4 d eine Zuckerkonzentration von mindestens 100 g/L vorlag. Eine weitere Aufkonzentrierung des Hydrolysats, die zusätzliche Prozesskosten verursachen würde, war somit nicht notwendig. Als initiale Konzentration an Biogazyme 2x wurden 3,0 FPU/g_{BTM} eingesetzt. Zum jeweiligen Zeitpunkt der Zugabe von Apfeltrester wurden, bezogen auf den

hinzugefügten Apfeltrester, jeweils 1,5 FPU/g_{BTM} zusätzlich hinzugegeben. Somit wurde bei diesem Ansatz eine Gesamtkonzentration von 1,8 FPU/g_{BTM} (9,0 mg_{B2x}/g_{BTM}) verwendet. Im Vergleich zur zuvor beschriebenen Hydrolyse wurde somit eine um 70 % reduzierte Menge an Biogazyme 2x verwendet. Als weitere Anpassung wurde ein niedriger konzentrierter Citrat-Puffer (50 mM, pH = 4,8) verwendet, der trotz einer geringeren Pufferkapazität die Stabilisierung des pH-Werts im Bereich von 4,0 - 4,8 ermöglichte. Der dabei erzielte Reaktions-verlauf ist in Abbildung 4.69 dargestellt.

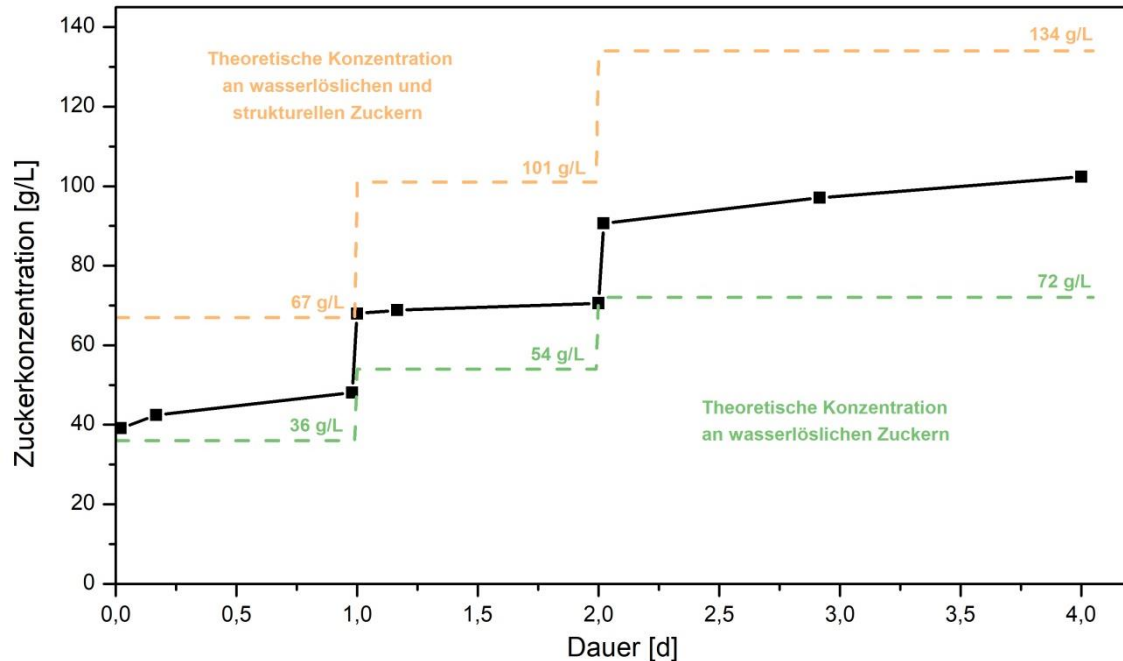


Abbildung 4.69: Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 50 mM Citrat-Puffer und 1,8 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x.

Im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse mit einer Gesamtkonzentration von 6,0 FPU/g_{BTM} konnte bei diesem Ansatz eine um ca. 30 % reduzierte Zunahme an Monosacchariden während der Reaktion detektiert werden. So wies der Verlauf der Zuckerkonzentration in allen drei Phasen der Hydrolyse eine geringere Steigung auf. Insgesamt ermöglichte die hier verwendete Menge an Biogazyme 2x die Bildung einer Zuckerkonzentration von 102,3 g/L nach 4 d. Unter Berücksichtigung der bereits monomer vorliegenden wasserlöslichen Zucker, entsprach dies einem Monomerisierungsgrad der strukturell gebundenen Polysaccharide von 49 %. Die anschließende Abtrennung des Restfeststoffs ermöglichte die Separierung von 0,60 kg_{Hydrolysat}/kg_{Reaktionsansatz}. Somit konnte belegt werden, dass eine geringere Enzymkonzentration nicht nur in einer niedrigeren Zuckerkonzentrationen der Flüssigphase resultierte, sondern auch eine schlechtere Abtrennung der Flüssigkeit mittels Zentrifugation verursachte. Als mögliche Ursache für diese Feststellung kann das noch teilweise intakt vorliegende Gerüst der Cellulose und Hemicellulose angeführt werden, das einer Komprimierung und somit Separierung des Restfeststoffs mittels Zentrifugation entgegen wirkt. Insgesamt konnten bei diesem Ansatz eine Ausbeute von 77,9 g_{Zucker}/kg_{AT} erzielt werden. Dies entspricht einem Nutzungsgrad von 44,0 %, bezogen auf alle in Apfeltrester enthaltenen Saccharide (s. Abbildung 4.70).

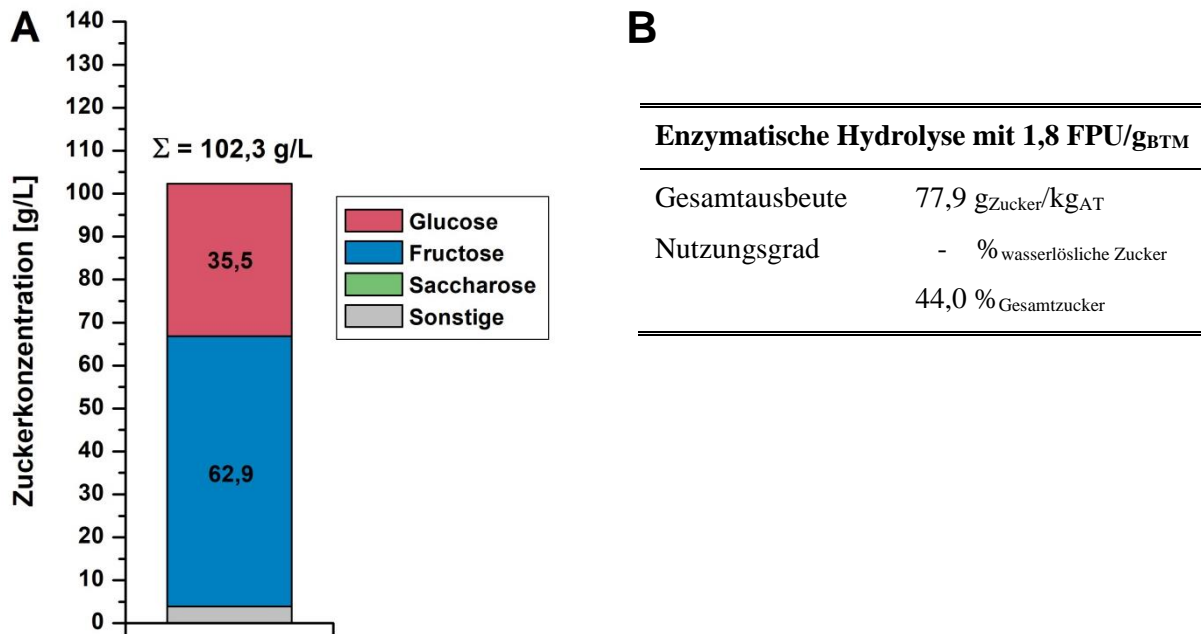


Abbildung 4.70: Enzymatische Hydrolyse von Apfelprester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 50 mM Citrat-Puffer und 1,8 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x, anschließende Separierung mittel Zentrifugation bei 8.500 rpm über 20 min; A - Zuckerzusammensetzung des abgetrennten Hydrolysats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfelprester enthaltenen Zucker.

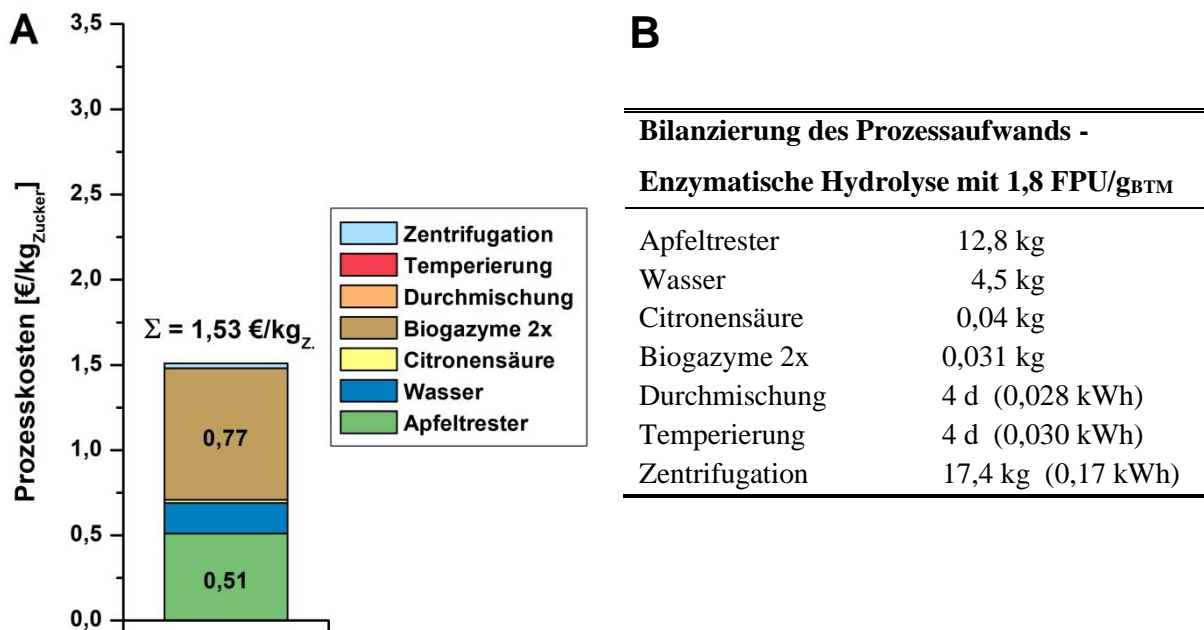


Abbildung 4.71: Bilanzierung der enzymatischen Hydrolyse von Apfelprester mit 1,8 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x und Feed-Strategie; A - Prozesskosten bezogen auf die Functional Unit von 1 kg_{Zucker}, B - Tabellarische Übersicht des Prozessaufwands zur Herstellung von 1 kg_{Zucker}.

Auf Grundlage dieses Ergebnisses und unter Berücksichtigung aller relevanten Prozessparameter konnte die in Abbildung 4.71 dargestellte Kostenberechnung angefertigt werden. Dabei wird ersichtlich, dass aufgrund des geringeren Monomerisierungsgrads eine größere Apfelprestermenge von 12,8 kg zur Herstellung von 1 kg_{Zucker} benötigt wurde. Die Kosten zur Bereitstellung dieser Menge an Apfelprester betrugen 0,51 €/kg_{Zucker}. Im Gegensatz hierzu lieferte die Reduktion der Enzymkonzentration eine deutliche Senkung der Prozesskosten auf 0,77 €/kg_{Zucker}. Somit konnte dieser Kostenpunkt im Vergleich

zur Hydrolyse mit 6,0 FPU/g_{BTM} um 63 % gesenkt werden. Auch die reduzierte Konzentration des Citrat-Puffers spiegelte sich positiv in der Bilanzierung wider. So konnten ca. 90 % der ursprünglichen Kosten an Citronensäure eingespart werden. Insgesamt konnte durch die Anpassung der Konzentration an Biogazyme 2x und des Citrat-Puffers deutlich reduzierte Kosten von 1,53 €/kg_{Zucker} erzielt werden. Im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse mit 6,0 FPU/g_{BTM} stellt dies eine Reduktion der Gesamtkosten um 47 % dar.

Zusammenfassung der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester

Zusammenfassend konnte bei der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester erfolgreich aufgezeigt werden, dass eine Monomerisierung der strukturell gebundenen Polysaccharide prinzipiell möglich ist. Somit konnte neben den wasserlöslichen Zuckern eine weitere Zuckerfraktion des Apfeltresters zur Herstellung der zuckerhaltigen Flüssigkeit genutzt werden. Positiv ist hierbei zu erwähnen, dass der zu hydrolysierende Apfeltrester direkt eingesetzt werden konnte. Eine aufwendige mechanische bzw. Vorbehandlung mit Säuren oder Basen, wie dies bei anderen lignocellulosehaltigen Reststoffen (z.B. Weizenstroh oder Maiskolbenreste) üblich ist, war somit nicht notwendig (Xu et al., 2010; Li et al., 2017). Bezogen auf die Prozessführung wurde eine Feed-Strategie angewendet, die eine zweimalige Erhöhung des Feststoffanteils an Apfeltrester von anfänglich 10 % (w/v) auf einen finalen Wert von 20 % (w/w) beinhaltete. Dadurch konnte über den gesamten Reaktionszeitraum eine ausreichende Durchmischung des Ansatzes gewährleistet werden. Gleichzeitig lieferte der eingesetzte Feststoff-anteil eine ausreichende Zuckermenge um eine Konzentration von > 100 g/L zu erreichen. Aus wirtschaftlicher Sicht stellen die Kosten für das verwendete Enzympräparat Biogazyme 2x den größten Kostenpunkt dar. So konnte bei einer Gesamtkonzentration von 6,0 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x zwar eine gesteigerte Monomerisierung der Polysaccharide und somit ein hoher Nutzungsgrad erzielt werden. Allerdings resultierte diese Enzymmenge in zu hohen Gesamtkosten, die im Vergleich zu anderen Herstellungsstrategien nicht rentabel sind. Dagegen stellte eine Enzymkonzentration von 1,8 FPU/g_{BTM} einen zu bevorzugenden Kompromiss zwischen Enzymkosten und Nutzungsgrad des Apfeltresters dar. Mit 1,53 €/kg_{Zucker} konnten hierbei im Vergleich zu bisherigen Prozessstrategien vergleichbare Herstellungskosten erzielt werden.

Bezogen auf die Cellulaseaktivität von Biogazyme 2 x konnte außerdem in Modellversuchen eine negative Beeinflussung der Enzymaktivität bei zunehmenden Konzentrationen an Glucose bzw. Fructose aufgezeigt werden. Hinsichtlich einer weiteren Optimierung dieser Prozessstrategie stellt somit eine vorgeschaltete Separierung der wasserlöslichen Zucker einen vielversprechenden Ansatz dar, um die vorliegende Produktinhibierung von Biogazyme 2x zu reduzieren. Zur Untersuchung dieser Feststellung und um die allgemeinen Prozesskosten weiter zu senken, wurden im folgenden Kapitel daher verschiedenen Prozessstrategien miteinander kombiniert.

4.3.3.4 Kombinierte Prozessführung der einzelnen Herstellungsstrategien

Die drei bisher untersuchten Herstellungsstrategien wiesen spezifische Vor- und Nachteile auf, die sich unterschiedlich stark auf die wirtschaftliche Rentabilität auswirkten. So entstanden beim zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester, aufgrund eines sehr geringen Nutzungsgrads der wasserlöslichen Zucker, hohe Kosten für die Bereitstellung der entsprechenden Menge an Apfeltrester. Durch den geringen Prozessaufwand fielen die Kosten des Auspressens dagegen sehr gering aus. Im Gegensatz hierzu ermöglichte eine dreistufige Extraktion mit Wasser einen höheren Nutzungsgrad der bereits monomer vorliegenden Zucker. Der Anteil der Apfeltresterkosten war daher geringer. Da allerdings zur Herstellung der zuckerhaltigen Flüssigkeit ein verhältnismäßig hoher Prozessaufwand erforderlich war, fielen bei diesen Prozessparametern anteilig höhere Kosten an. Bei der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester konnte ebenfalls ein hoher Nutzungsgrad der in Apfeltrester enthaltenen Zucker erzielt werden. Als nachteilig stellten sich hierbei die hohen Kosten der benötigten Menge des Enzympräparats Biogazyme 2x heraus.

Auf Grundlage dieser Feststellungen wurde eine kombinierte Prozessführung untersucht, die idealerweise eine Eliminierung bzw. Reduktion der spezifischen Nachteile ermöglichte. Zur wirtschaftlichen Überprüfung der kombinierten Herstellungsstrategien wurden analog zum bisherigen Vorgehen, die Prozesskosten mit dem in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Bilanzierungsmodell berechnet.

Zusätzliches Auspressen von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser

Wie zuvor beschrieben, stellte das zusätzliche Auspressen eine simple Möglichkeit dar, um eine zuckerhaltige Flüssigkeit von festen Bestandteilen des Apfeltresters zu separieren. Daher wurde bei dieser kombinierten Herstellungsstrategie der Apfeltrester zunächst bei 20 bar für 20 min hydraulisch ausgepresst. Bei einer identischen Pressausbeute (vgl. Kapitel 4.3.3.1) konnte hierbei, wie in Abbildung 4.72 dargestellt, eine Zuckerkonzentration von 109,6 g/L im Presssaft detektiert werden. Auf Basis des ausgepressten Apfeltresters wurde anschließend eine weitere Extraktion der noch verbleibenden wasserlöslichen Zucker durchgeführt. Hierzu wurde analog zu Kapitel 4.3.3.2 ein Extraktionsverhältnis von 2/1 (w/w, ausgepresster Apfeltrester/Wasser) verwendet. Das hinzugegebene Wasser wurde dabei nach einer Kontaktzeit von 20 min mittels Pressung bei 20 bar abgetrennt. Bezogen auf die optimale Anzahl an Extraktionsstufen konnte in Vorversuchen mit zwei Prozessstufen der wirtschaftlich interessanteste Ansatz identifiziert werden. Somit fielen bei diesem Teil der Prozessstrategie zwei Extrakte an, die mit 62,9 g/L und 37,2 g/L abnehmende Zuckerkonzentrationen aufwiesen.

Da beide Extrakte eine Zuckerkonzentration von < 100 g/L aufwiesen, wurden diese separat voneinander aufkonzentriert. Nach der anschließenden Vereinigung von allen drei zuckerhaltigen Flüssigkeiten konnte die in Abbildung 4.73, A dargestellte Gesamtkonzentration von 135,8 g/L Zucker detektiert werden.

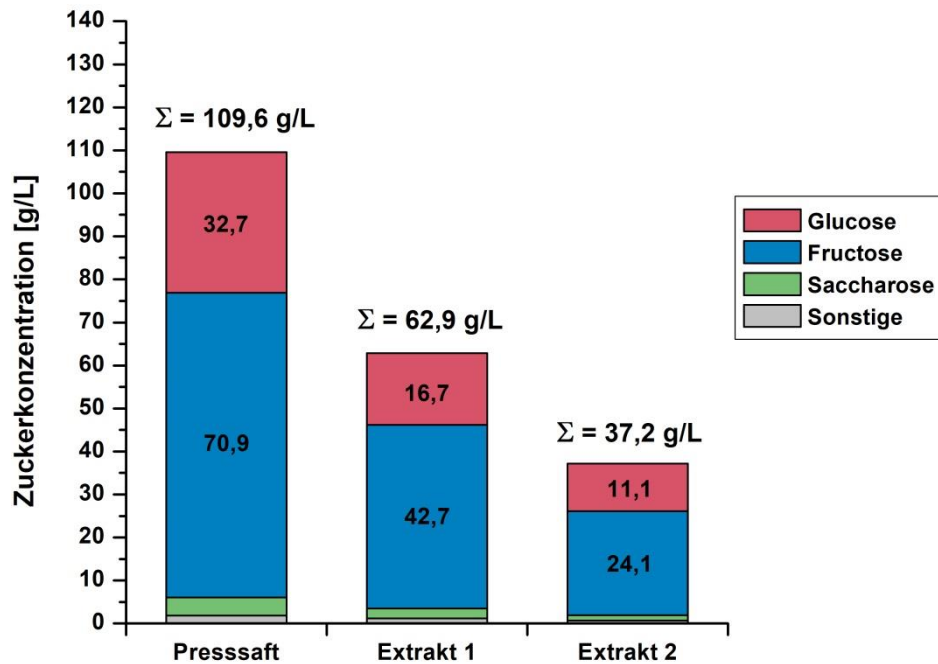
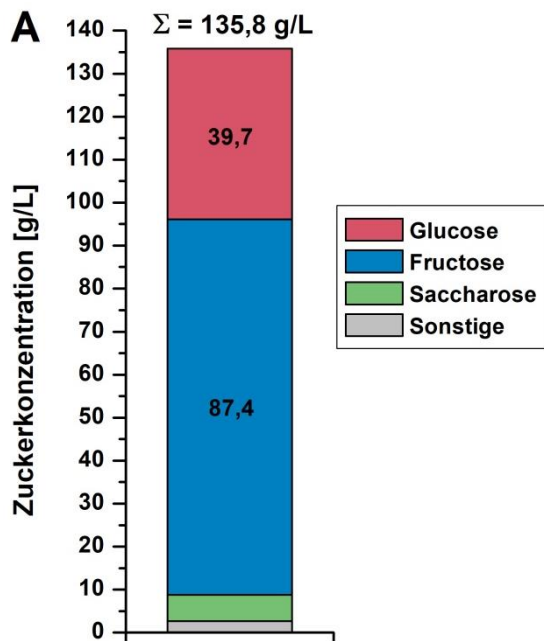


Abbildung 4.72: Zuckerkonzentration des Presssafts und der beiden Extrakte beim zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester mittels HP-2 H (20 bar, 20 min) gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) und jeweiliger Separierung mittels HP-2 H Presse (20 bar).



B

Zusätzliches Auspressen gefolgt von zweistufiger Extraktion mit Wasser

Gesamtausbeute	69,9 g _{Zucker} /kg _{AT}
Nutzungsgrad	73,6 % wasserlösliche Zucker
	39,5 % Gesamtzucker

Abbildung 4.73: Zusätzliches Auspressen von Apfeltrester mittels HP-2 H (20 bar, 20 min) gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1); A - Zuckerzusammensetzung des aufkonzentrierten und vereinigten Konzentrats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.

Bezogen auf die Zusammensetzung der einzelnen Zucker stellten Fructose mit 64 %, gefolgt von Glucose mit 29 %, die größten Fraktionen dar. Mit 5 % bzw. 2 % fiel der Anteil an Saccharose und anderer Monosaccharide dagegen deutlich geringer aus. Ein Vergleich dieses Ergebnisses mit vorherigen Prozessstrategien zeigt auf, dass bei allen Herstellungsverfahren, die eine ausschließliche

Nutzung von wasserlöslichen Zuckern ermöglichten, dieses Zuckerverhältnis erzielt wurde. Somit kann belegt werden, dass die Art der Separierung und eine optionale thermische Aufkonzentrierung keinen Einfluss auf die anteilige Zuckerzusammensetzung hatte. Auf Grundlage der erzielten Zuckerkonzentration und unter Berücksichtigung der jeweiligen Ausbeuten der einzelnen Prozessschritte konnte eine Gesamtausbeute von $69,9 \text{ g}_{\text{Zucker}}/\text{kg}_{\text{Apfeltrester}}$ erzielt werden. Dies entspricht einem Nutzungsgrad an wasserlöslichen Zuckern von 73,6 % bzw. 39,5 % bezogen auf alle in Apfeltrester enthaltenen Zucker. Die hier untersuchte kombinierte Prozessführung ermöglichte somit einen fast identischen Nutzungsgrad wie die Prozessstrategie der dreistufigen Extraktion mit Wasser (vgl. Kapitel 4.3.3.2). Da hierbei allerdings eine zusätzliche Extraktionsstufe, anstelle einer vorgeschalteten Auspressung verwendet wurde, zeigt die in Abbildung 4.74 dargestellte Kostenberechnung ein abweichendes Bilanzierungsergebnis.

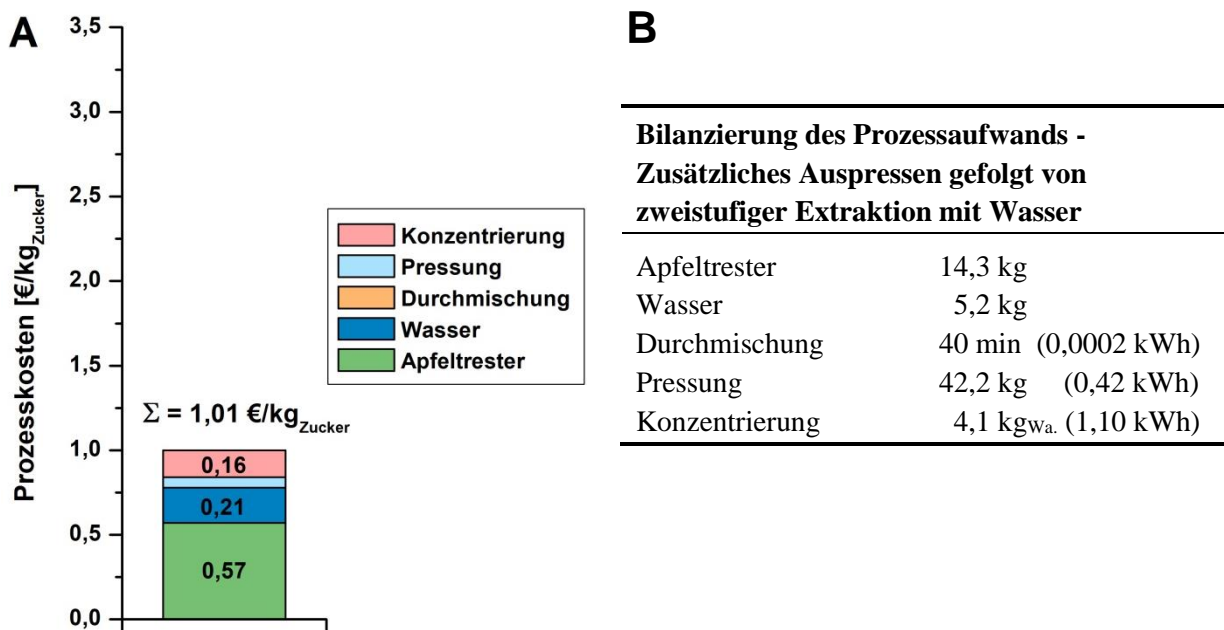


Abbildung 4.74: Bilanzierung des zusätzlichen Auspressens von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser; A - Prozesskosten bezogen auf die Functional Unit von $1 \text{ kg}_{\text{Zucker}}$, B - Tabellarische Übersicht des Prozessaufwands zur Herstellung von $1 \text{ kg}_{\text{Zucker}}$.

Zunächst treten bei der kombinierten Prozessstrategie, aufgrund der fast identischen Gesamtausbeuten, ebenfalls Kosten von $0,57 \text{ €/kg}_{\text{Zucker}}$ für die Bereitstellung der benötigten Menge an Apfeltrester auf. Dagegen fallen, im Vergleich zur dreistufigen Extraktion mit Wasser, die sonstigen Prozesskosten geringer aus. So konnte beispielsweise die benötigte Wassermenge und somit auch die Kosten für diese Prozessgröße um ca. 50 % auf $0,21 \text{ €/kg}_{\text{Zucker}}$ reduziert werden. Weiter musste für die Aufkonzentrierung von lediglich zwei Extrakten ca. 60 % weniger Wasser verdunstet werden. Dies resultiert in geringen Kosten für die Aufkonzentrierung von $0,16 \text{ €/kg}_{\text{Zucker}}$. Somit belaufen sich die Gesamtkosten zur Herstellung von $1 \text{ kg}_{\text{Zucker}}$ in gelöster Form und einer Zuckerkonzentration von mindestens 100 g/L auf $1,01 \text{ €/kg}_{\text{Zucker}}$. Im Vergleich zur dreistufigen Extraktion mit Wasser stellt dieses Ergebnis eine Kostenreduktion von 33 % dar. Auch im Vergleich zur bisher günstigsten Herstellungsvariante, dem zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester bei 20 bar über 20 min, konnten die Gesamtkosten um 27 % reduziert werden. Somit konnte durch eine kombinierte Prozessführung aus zusätzlichem Auspressen und zweistufiger Extraktion mit Wasser die wirtschaftliche Rentabilität des Herstellungsprozesses deutlich verbessert werden.

Zusätzliches Auspressen von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser und einer enzymatischen Hydrolyse auf Basis des anfallenden Reststoffs

Bei der zuvor beschriebenen kombinierten Prozessstrategie fiel neben der zuckerhaltigen Flüssigkeit ebenfalls ein Apfeltrester-Reststoff an, der eine reduzierte Konzentration an wasserlöslichen Monosacchariden aufwies. Bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Menge an Apfeltrester von 14,3 kg, die zur Herstellung von 1 kg_{Zucker} benötigt wurden, fallen insgesamt 11,7 kg dieses Reststoffs an. Um auch noch die darin enthaltenen strukturellen Polysaccharide nutzen zu können, wurde auf Basis dieses Reststoffs und der in Kapitel 4.3.3.3 beschriebenen Methodik eine enzymatische Hydrolyse mit Feed-Strategie und 1,8 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x durchgeführt. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die Cellulaseaktivität von Biogazyme 2x durch die Präsenz von monomer vorliegender Glucose und in geringerem Ausmaß auch durch Fructose negativ beeinflusst wurde (s. Kapitel 4.3.3.3). Da allerdings bei dem hier verwendeten Substrat eine reduzierte Konzentration an wasserlöslichen Monosacchariden vorlag, kann im Vergleich zu frischem Apfeltrester von einer prinzipiell höheren Enzymaktivität ausgegangen werden. Der Reaktionsverlauf der enzymatischen Hydrolyse mit Apfeltrester-Reststoff ist in Abbildung 4.75 darstellt.

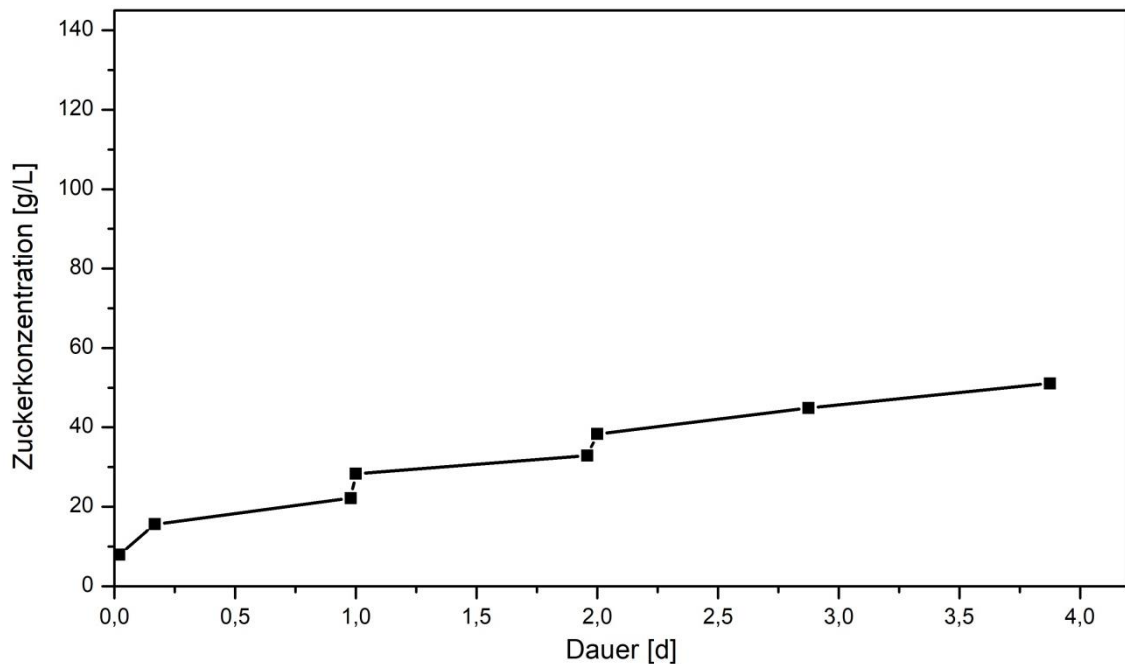


Abbildung 4.75: Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester-Reststoff mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 50 mM Citrat-Puffer und 1,8 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x.

Da dem eingesetzten Apfeltrester-Reststoff bereits im Vorfeld ein Großteil der monomer vorliegenden wasserlöslichen Zucker entzogen wurde, konnte zu Beginn der enzymatischen Hydrolyse, bei einem Feststoffanteil von 10 % (w/w), nur eine anfängliche Zuckerkonzentration von 7,9 g/L festgestellt werden. Im Vergleich zur Hydrolyse mit frischem Apfeltrester stellt dies eine Reduktion der Anfangskonzentration um 80 % dar (vgl. Kapitel 4.3.3.3). Auch bei der Erhöhung des Feststoffanteils auf 15 % (w/w) nach einem Tag bzw. auf 20 % (w/w) nach zwei Tagen konnte ein deutlich geringerer sprunghafter Anstieg der Zuckerkonzentration detektiert werden. Bezogen auf die Monomerisierung von Polysacchariden konnte innerhalb der ersten Stunden eine starke Zunahme der Konzentration an Monosacchariden aufgezeigt werden, die im weiteren Reaktionsverlauf allerdings abnahm und vielmehr

eine lineare Freisetzung an Zuckern aufwies. So konnte in der Flüssigphase nach 4 d eine Gesamtkonzentration von 51,1 g/L nachgewiesen werden, die sich zu 38 % aus der Fraktion der wasserlöslichen Zucker und zu 62 % aus hydrolysierten Polysacchariden zusammensetzte. Somit bestehen 31,6 g/L der im Hydrolysat enthaltenen Monosaccharide aus zuvor strukturell gebundenen Zuckern der Cellulose und Hemicellulose. Zur Einordnung dieses Ergebnisses wurde ebenfalls der Anteil an monomerisierten Polysacchariden bei der enzymatischen Hydrolyse von frischem Apfeltrester berechnet. Die unter identischer Prozessführung durchgeführte Hydrolyse ist in Kapitel 4.3.3.3 beschrieben und lieferte eine Konzentration von 23,2 g/L Zuckern, die während der enzymatischen Hydrolyse monomerisiert wurden. Somit konnte durch eine vorgeschaltete Separierung von wasserlöslichen Zuckern das Ergebnis der anschließenden enzymatischen Hydrolyse um ca. 35 % verbessert werden.

Nach der viertägigen enzymatischen Hydrolyse wurde der Reaktionsansatz für 20 min bei 8.500 rpm zentrifugiert. Dabei konnten 0,42 kg_{Hydrolysat}/kg_{Reaktionsansatz} von nicht hydrolysiertem Feststoff separiert werden. Da die Zuckerkonzentration des Hydrolysats unterhalb der erforderlichen Konzentration von mindestens 100 g/L lag, wurde diese mittels thermischer Verdunstung von Wasser aufkonzentriert. Anschließend wurde das aufkonzentrierte Hydrolysat mit dem in vorherigen Prozessstufen anfallenden Presssaft und den aufkonzentrierten Extrakten vereinigt. Insgesamt konnte somit nach dem zusätzlichen Auspressen, gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser und der enzymatischen Hydrolyse des dabei anfallenden Reststoffs, eine vereinigte zuckerhaltige Flüssigkeit mit einer Zuckerkonzentration von 120,6 g/L hergestellt werden (s. Abbildung 4.76).

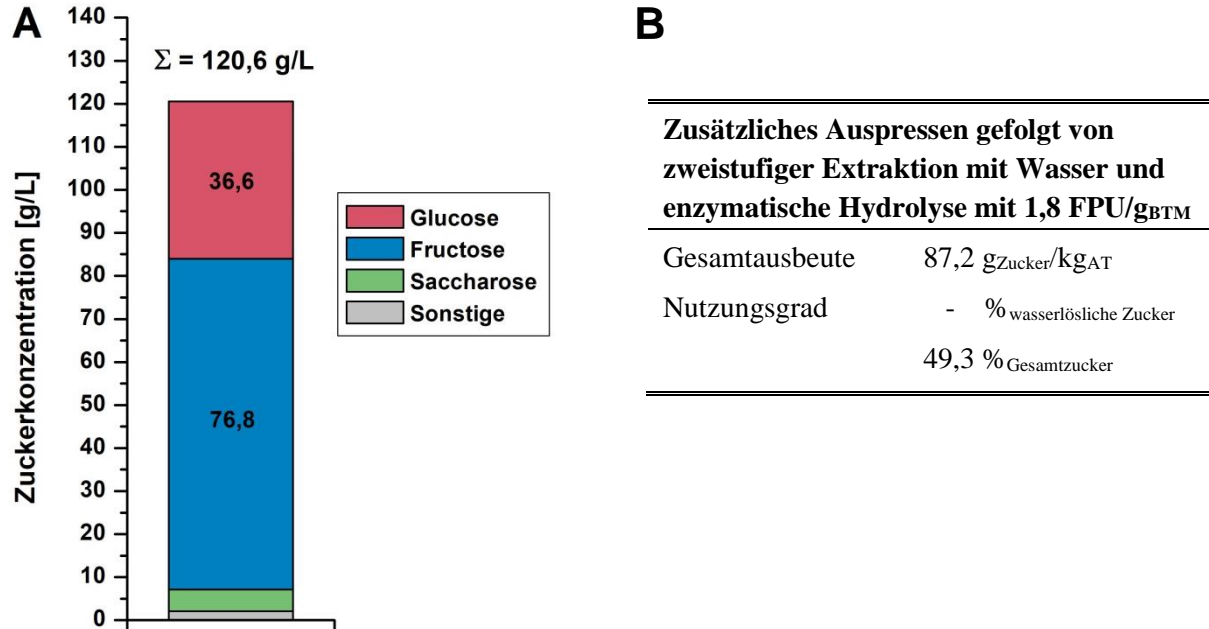


Abbildung 4.76: Zusätzliches Auspressen von Apfeltrester mittels HP-2 H (20 bar, 20 min) gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) und enzymatische Hydrolyse des Apfeltrester-Restfeststoffs mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm (insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 50 mM Citrat-Puffer und 1,8 FPU/g_{BTM} Biogazyme 2x; A - Zuckerzusammensetzung des aufkonzentrierten und vereinigten Konzentrats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.

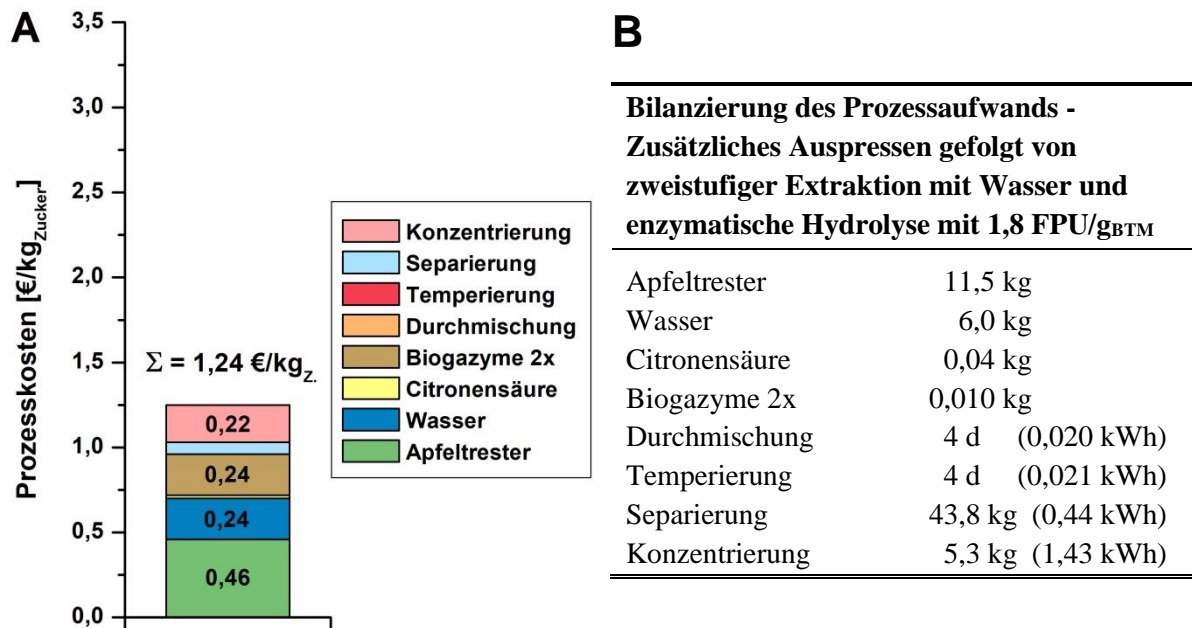


Abbildung 4.77: Bilanzierung des zusätzlichen Auspressens von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser und enzymatische Hydrolyse des Apfeltrester-Restfeststoffs mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie; A - Prozesskosten bezogen auf die Functional Unit von 1 kg_{Zucker}, B - Tabellarische Übersicht des Prozessaufwands zur Herstellung von 1 kg_{Zucker}.

Zusammenfassung und Einordnung der kombinierten Prozessstrategien

Hinsichtlich einer wirtschaftlichen Bewertung der untersuchten Prozessstrategien stellte sich das verwendete Bilanzierungsmodell als hilfreiches Werkzeug heraus. So konnten innerhalb der Herstellungsprozesse spezifische Kostenpunkte identifiziert und der Einfluss von vorgenommenen Anpassungen unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten bewertet werden. Einschränkend ist allerdings zu erwähnen, dass alle Untersuchungen ausschließlich im Labormaßstab durchgeführt wurden. Potenziell auftretende Effekte bei einer Übertragung in einen industriell relevanten Maßstab, wie beispielsweise eine abweichende Pressausbeute beim zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester, wurden somit nicht berücksichtigt. Außerdem beruhen die Kostenberechnungen auf vereinfachenden Modellannahmen, die nur eingeschränkt die real anfallenden Kosten widerspiegeln. Deshalb wird an dieser Stelle auf einen Vergleich der hier erzielten Gesamtkosten mit bereits bestehenden industriellen Herstellungsverfahren zur Zuckergewinnung verzichtet. Unabhängig von den Prozesskosten kann allerdings angeführt werden, dass die hier hergestellten zuckerhaltigen Flüssigkeiten auf einem agrarischen Reststoff beruhen, der nicht in direkter Konkurrenz zur Lebensmittelindustrie steht. Im Vergleich zur industriellen Zuckerherstellung auf Basis von Zuckerrüben oder Zuckerrohr werden somit keine zusätzlichen Anbauflächen benötigt (Tenenbaum, 2008; Magyar et al., 2016).

Trotz dieser Einschränkungen ist ein wirtschaftlicher Vergleich der verschiedenen Herstellungsstrategien untereinander sinnvoll. Denn ein hoher Nutzungsgrad der in Apfeltrester enthaltenen Zucker ist nicht direkt gleichbedeutend mit geringen Herstellungskosten. Vielmehr ist es das Ziel, einen optimalen Kompromiss zwischen Zuckerausbeute und erforderlichlichem Prozessaufwand zu finden. In

diesem Zusammenhang konnte durch eine gezielte Verknüpfung der in Kapitel 4.3.3.1 - Kapitel 4.3.3.3 beschriebenen Einzelstrategien eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit festgestellt werden. So ermöglichte das kombinierte zusätzliche Auspressen von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser die kostengünstigste Herstellungsvariante unter allen untersuchten Prozessstrategien. Auf Grundlage des verwendeten Bilanzierungsmodells belaufen sich die Herstellungskosten von einem 1 kg_{Zucker}, das in gelöster Form und mit einer Zuckerkonzentration von > 100 g/L vorliegt, auf 1,01 €. Dabei konnte insgesamt eine Zuckerausbeute von 69,9 g_{Zucker}/kg_{AT} erzielt werden. Durch eine nachgeschaltete enzymatische Hydrolyse des dabei anfallenden Apfeltrester-Reststoffs, konnten zwar zusätzlich auch strukturelle Zucker monomerisiert und somit eine erhöhte Zuckermenge von 87,2 g_{Zucker}/kg_{AT} nutzbar gemacht werden, dies resultierte allerdings in einer Erhöhung der Herstellungskosten.

Somit stellt die kombinierte Prozessstrategie des zusätzlichen Auspressens von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser die wirtschaftlichste Herstellungsvariante dar. Für die in den folgenden Kapiteln beschriebene fermentative Umsetzung zu Fumarsäure wurden daher ausschließlich zuckerhaltige Flüssigkeiten verwendet, die mit dieser Prozessstrategie hergestellt wurden.

4.3.4 Aufreinigung der zuckerhaltigen Flüssigkeit zu Apfeltrester-Saft

Die mittels zusätzlichem Auspressen von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser hergestellte zuckerhaltige Flüssigkeit ist in Abbildung 4.78, A abgebildet. Neben einer deutlich erkennbaren orangenen Färbung konnte qualitativ auch das Vorliegen von Trübstoffen innerhalb der Flüssigkeit nachgewiesen werden. Bezogen auf die anteilige Zuckerzusammensetzung dieses Ansatzes konnte die in Abbildung 4.78, B dargestellte Zuckerverteilung festgestellt werden. Wie bereits zuvor beschrieben, stellten Fructose, gefolgt von Glucose die größten Zuckerfraktionen innerhalb des Ansatzes dar. In geringeren Anteilen waren auch Saccharose und anderen Monosaccharide enthalten. Die absolute Zuckerkonzentration der Flüssigkeit ließ sich prinzipiell durch eine integrierte Aufkonzentrierung innerhalb des Herstellungsprozesses beliebig variieren. Hinsichtlich einer fermentativen Biokonversion zu Fumarsäure ermöglichte dies eine gezielte Einstellung der gewünschten Konzentration an Gesamtzuckern.

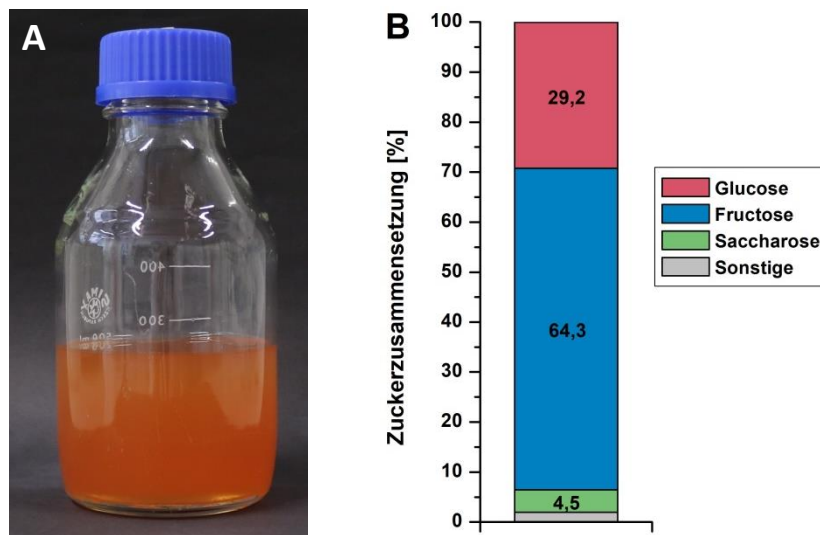


Abbildung 4.78: A - Aufnahme der zuckerhaltigen Flüssigkeit (mittels zusätzlichem Auspressen von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser hergestellt), B - Zuckerzusammensetzung der zuckerhaltigen Flüssigkeit.

Um eine möglichst effektive Umsetzung der Zucker zu Fumarsäure zu realisieren, wurde die zuckerhaltige Flüssigkeit zunächst in zwei aufeinanderfolgenden Prozessschritten aufgereinigt. Dies beinhaltete eine Fällung von Trübstoffen durch den Einsatz von Calciumcarbonat und eine Aufreinigung mittels Kationentauscher. Beide Prozessschritte werden in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben. Die abschließend hergestellte aufgereinigte zuckerhaltige Flüssigkeit wird dabei als Apfeltrester-Saft bezeichnet.

4.3.4.1 Fällung von Trübstoffen mit Calciumcarbonat

Bei der fermentativen Herstellung von Fumarsäure mit *R. arrhizus* NRRL 1526 wird Calciumcarbonat zur Regulierung des pH-Wertes eingesetzt. In diesem Zusammenhang konnte in Vorversuchen mit Calciumcarbonat und nicht aufgereinigter zuckerhaltiger Flüssigkeit das Ausfallen eines Feststoffs beobachtet werden. In den entsprechenden Kultivierungen verursachte dies einen starken Anstieg der Viskosität und verhinderte somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung der vorliegenden Biomasse. Als Konsequenz wurde bei diesen Ansätzen hauptsächlich Ethanol gebildet. Eine effektive Produktion von Fumarsäure war nicht möglich.

Um die Viskosität des Kultivierungsansatzes zu reduzieren und somit potenziell die Bildung von Fumarsäure zu begünstigen, wurden enthaltene Trübstoffe in einer vorgeschalteten Prozessstufe entfernt. Hierzu wurde die zuckerhaltige Flüssigkeit mit 1 % (w/w) Calciumcarbonat versetzt und der Ansatz für 5 min durchmischt. Dabei konnte mit fortschreitender Reaktionsdauer eine Verfärbung des Ansatzes beobachtet werden (s. Abbildung 4.79). Als Nebeneffekt wurde bei dieser Reaktion der pH-Wert der zuckerhaltigen Flüssigkeit von anfänglich 3,6 auf einen Wert von 6,3 angehoben.



Abbildung 4.79: Zeitlicher Verlauf der Fällung von Trübstoffen bei der zuckerhaltigen Flüssigkeit mit 1 % (w/w) Calciumcarbonat, Durchmischung des Reaktionsansatzes mittels Magnetrührer für 5 min.

Zum Entfernen der ausgefällten Trübstoffe und des noch vorliegenden Calciumcarbonats wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert. Die dabei separierte Flüssigkeit ist in Abbildung 4.80, A abgebildet und wies im Vergleich zur ursprünglich eingesetzten zuckerhaltigen Flüssigkeit eine abweichende Färbung auf. So konnte neben einer deutlichen Braunfärbung qualitativ auch eine geringere Trübung der Flüssigkeit aufgezeigt werden. Ergänzend hierzu ist in Abbildung 4.80, B die getrocknete Fraktion an abgetrennten Feststoffen abgebildet. Anhand des bräunlich verfärbten Calciumcarbonats konnte ebenfalls eine Abtrennung von Trübstoffen qualitativ belegt werden. Bezogen auf ein mögliches Mitfällen von vorliegenden Zuckern wurde die Zuckerkonzentration der separierten Flüssigkeit untersucht. Dabei wurde im Vergleich zur ursprünglich vorliegenden Menge an Zuckern ein Rückgang der absoluten Konzentration von 1,8 % festgestellt. Die spezifische Zusammensetzung der einzelnen Saccharide wurde hierbei allerdings nicht verändert.

Abschließend wurde zur Kontrolle der Fällung die separierte Flüssigkeit erneut mit Calciumcarbonat versetzt und durchmischt. Da hierbei kein weiteres Ausfallen von Trübstoffen beobachtet werden konnte, stellt ein Feststoffanteil von 1 % (w/w) eine ausreichende Menge an Calciumcarbonat dar, um die hier maximal mögliche Abtrennung von Trübstoffen zu erzielen. Somit konnte durch eine vorgeschaltete Fällung mittels Calciumcarbonat der Anteil an Trübstoffen in der zuckerhaltigen Flüssigkeit erfolgreich reduziert werden.

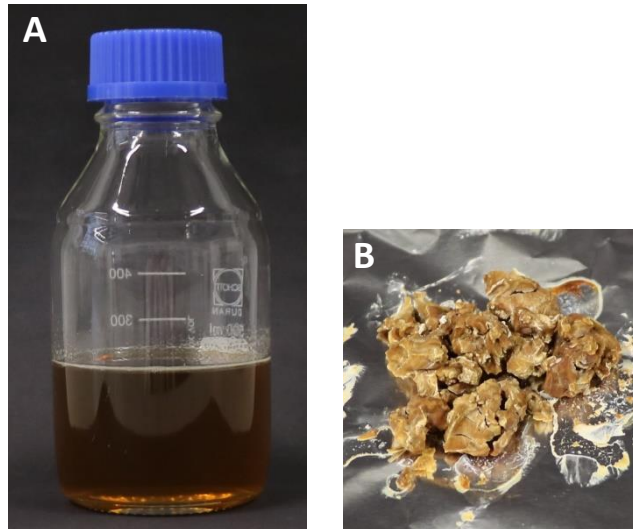


Abbildung 4.80: A - Aufnahme der zuckerhaltigen Flüssigkeit nach der Fällung von Trübstoffen mit 1 % (w/w) Calciumcarbonat, B - Getrockneter Restfeststoff nach der Separation mittels Zentrifugation (8.500 rpm für 10 min).

4.3.4.2 Aufreinigung mittels Kationentauscher

Hinsichtlich einer weiteren Entfernung von Trübstoffen wurde die zuckerhaltige Flüssigkeit in einem zweiten Prozessschritt weiter aufgereinigt. Hierzu wurde eine Trennsäule mit dem Kationentauscher Dowex 50WX8 befüllt und die zu reinigende Flüssigkeit über die Säule geleitet. Aufgrund der dichten Packung des Trennmaterials erfolgte eine Abtrennung von Trübstoffen zum einen mittels Filtration. Zum anderen wurden positiv geladene Moleküle an den Kationentauscher gebunden und somit der Flüssigkeit entzogen. Durch ein zweimaliges Durchleiten der ausgefällten zuckerhaltigen Flüssigkeit über die Trennsäule und einer zwischenzeitlich durchgeführten Regeneration des Kationentauschers konnte der in Abbildung 4.81 dargestellte aufgereinigte Apfeltrester-Saft gewonnen werden.

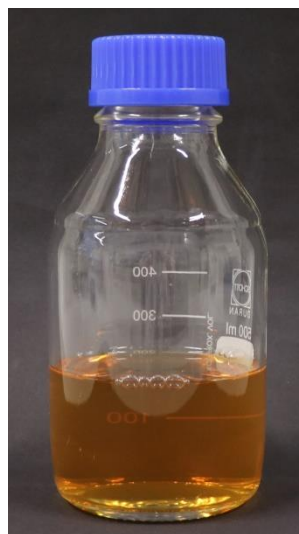


Abbildung 4.81: Aufnahme des aufgereinigten Apfeltrester-Safts nach der Fällung von Trübstoffen mit Calciumcarbonat und der zweimaligen Aufreinigung mittels Kationentauscher-Säule (Dowex 50WX8).

Im Gegensatz zur ursprünglich eingesetzten zuckerhaltigen Flüssigkeit stellte der aufgereinigte Apfeltrester-Saft eine klare, leicht orangefarbene Flüssigkeit dar. Somit konnte qualitativ eine weitere Abtrennung von Trübstoffen aufgezeigt werden. Bezogen auf eine Reduktion an Kationen konnte die Konzentration an wachstumsrelevantem Ammonium von 10,3 mg/L auf 2,7 mg/L reduziert werden. Dies ist ein bedeutender Nebeneffekt hinsichtlich einer später untersuchten wachstumsentkoppelten Fumarsäureproduktion (s. Kapitel 4.3.6). Bezüglich der absoluten Zuckerkonzentration konnten durch den zweimaligen Einsatz der Kationentauscher-Säule ein Rückgang der ursprünglichen Zuckerkonzentration um 4,8 % detektiert werden. Als Ursache für die ungewollte Reduktion können Verdünnungseffekte mit Wasser angeführt werden, welche nach der Regeneration des Kationentauschers in der Trennsäule vorlagen. Die anteilige Zusammensetzung der Zucker wurde hierdurch allerdings nicht verändert.

Zusammenfassend konnte durch die Aufreinigung mittels Kationentauscher-Säule und einer vorgeschalteten Fällung mit Calciumcarbonat die optische Trübung der Flüssigkeit erfolgreich reduziert werden. Der prinzipielle Nutzen dieses Aufreinigungsschrittes wurde abschließend anhand von Kultivierungen mit *R. arrhizus* NRRL 1526 untersucht. Dabei konnten mit der zuckerhaltigen Flüssigkeit, die nur durch Fällung mit Calciumcarbonat aufgereinigt wurde, keine reproduzierbaren Kultivierungsergebnisse erzielt werden. So verhinderte das Auftreten von unterschiedlichen Morphologieformen und das daraus resultierende abweichende Produktionsverhalten eine gleichbleibende Produktion von Fumarsäure. Der Einsatz des zusätzlich mittels Kationentauscher aufgereinigten Apfeltrester-Safts ermöglichte dagegen reproduzierbare Kultivierungen, die in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben werden.

4.3.5 Kultivierung mit Vorkultur und Apfeltrester-Saft

Um auf Basis des zuvor hergestellten Apfeltrester-Safts Fumarsäure zu produzieren, wurde im Rahmen dieses Kapitels die Kultivierungsstrategie mit Vorkultur angewendet. Dies beinhaltet zunächst eine Biomasseanzucht von *R. arrhizus* NRRL 1526 in einer Vorkultur mit optimiertem Medium C und Glucose als Kohlenstoffquelle. Für die anschließende Hauptkultur wurden 90 mL Apfeltrester-Saft in einen 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen vorgelegt und die in optimierten Medium C enthaltenen Spurenelemente sowie 0,3 g/L KH_2PO_4 und 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hinzugegeben. Zur Regulierung des pH-Wertes wurden dem Ansatz außerdem 50 g/L Calciumcarbonat zugesetzt. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte mit 10 mL Vorkultur, die nach einer Kultivierungsdauer von 24 h lose Mycel-Morphologie aufwies. Der während der Hauptkultur detektierte Kultivierungsverlauf und die dabei aufgetretene Morphologie sind in Abbildung 4.82 dargestellt.

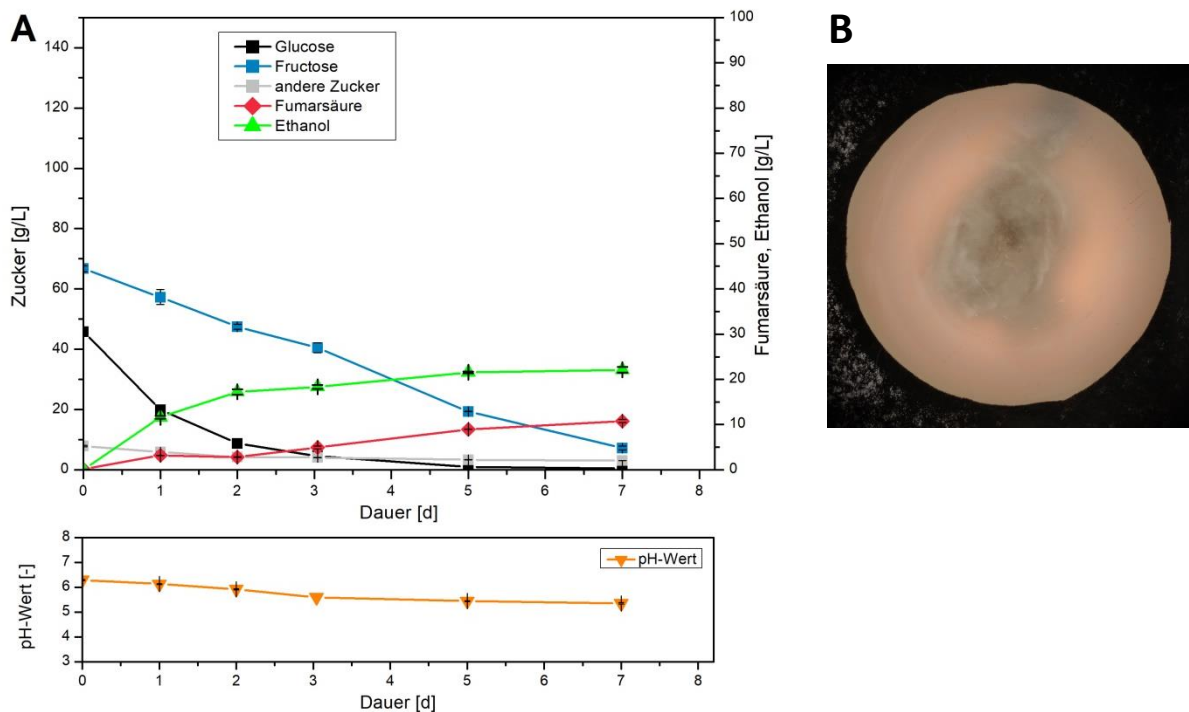


Abbildung 4.82: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit Vorkultur und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (inkl. Spurenelemente, 0,3 g/L KH_2PO_4 und 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR); A - Verlauf der Kultivierung, B - Aufnahme der Morphologie nach 7 d.

Zu Beginn der Hauptkultur konnte eine initiale Gesamtkonzentration von 120,4 g/L Zucker im Kultivierungsansatz nachgewiesen werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der relative Anteil an Glucose durch die Zugabe von 10 % (v/v) Vorkultur zusätzlich erhöht wurde. Bezogen auf die Verstoffwechslung der einzelnen Zuckerfraktionen konnte bei Glucose die stärkste Konzentrationsabnahme während der Kultivierung beobachtet werden. So konnte die anfänglich vorliegende Glucosekonzentration innerhalb von 5 d vollständig umgesetzt werden. Im Gegensatz hierzu wurde eine reduzierte Abnahme der Konzentration von Fructose und anderen Zuckern festgestellt, die keinen Vollumsatz innerhalb des untersuchten Kultivierungszeitraums ermöglichte. Bezüglich der Produktion von Fumarsäure konnte nach 7 d ein Endtiter von lediglich 10,8 g/L

nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,10 g/g und einer Produktivität von 0,06 g/(L·h). Als Ursache für die geringe Produktion von Fumarsäure kann die Zusammenlagerung der Biomasse in einem kompakten Klumpen angeführt werden (s. Abbildung 4.82, B). Aufgrund eines ungünstigen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses begünstigt dies vor allem eine übermäßige Akkumulation von Ethanol. Somit konnte auf Basis des Apfeltrester-Safts und unter Anwendung der hier untersuchten Kultivierungsbedingungen keine für die Produktion von Fumarsäure geeignete Morphologie erzielt werden.

Dieses Ergebnis steht somit im Widerspruch zu Kultivierungen mit synthetischem Apfeltrester-Medium (s. Kapitel 4.2.2.2). Bei letztgenannten Kultivierungsansätzen konnte unter identischen Kultivierungsbedingungen und einer vergleichbaren Zuckerzusammensetzung in optimiertem Medium C ein Zusammenlagern der Biomasse verhindert werden. Vielmehr konnte mit synthetischem Apfeltrester-Medium die Ausbildung von loser Mycel-Morphologie und die Produktion von 68,3 g/L Fumarsäure nach 10 d erzielt werden. Daher kann die spezifische Zuckerzusammensetzung im aufgereinigten Apfeltrester-Saft als mögliche Ursache für die Klumpenbildung ausgeschlossen werden. Im Gegensatz hierzu ist prinzipiell eine negative Beeinflussung der Morphologie aufgrund von weiteren Inhaltsstoffen des aufgereinigten Apfeltrester-Safts denkbar. So könnten bei der Herstellung der zuckerhaltigen Flüssigkeit theoretisch Störstoffe aus dem Apfeltrester in die Flüssigphase übergegangen sein, die die Ausbildung von Klumpen begünstigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierzu allerdings keine Untersuchungen angestellt, um potenzielle Störstoffe zu identifizieren und deren Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von *R. arrhizus* NRRL 1526 zu untersuchen. Als weitere mögliche Ursache für die Klumpenbildung kann das prinzipielle Vorliegen einer weiteren Stickstoffquelle im Apfeltrester-Saft angeführt werden. So wurde zwar nach der Aufreinigung mittels Kationentauscher nur eine sehr geringe Konzentration an gelöstem Ammonium detektiert (s. Kapitel 4.3.4.2). Allerdings könnten nicht weiter definierte organische Verbindungen, wie beispielsweise in der Flüssigkeit gelöste Aminosäuren, als zusätzliche Stickstoffquelle im Apfeltrester-Saft enthalten sein. In Kombination mit der eingesetzten Konzentration von 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ könnte somit eine zu hohe Menge an Stickstoff vorgelegen haben, die in der Ausbildung von Klumpen resultierte.

Um einer übermäßigen Produktion an Biomasse entgegenzuwirken, wurde eine zweite Kultivierung mit Apfeltrester-Saft durchgeführt. Hierbei wurde allerdings auf eine Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in der Hauptkultur verzichtet. Somit steht der eingesetzten Biomasse kein wesentlich zugesetztes Ammonium für ein weiteres Wachstum zur Verfügung. Alle weiteren Kultivierungsbedingungen wurden analog zur vorherigen Kultivierung übernommen. Der mittels Einzelbestimmung erzielte Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.83 dargestellt.

Auch bei diesem Kultivierungsansatz wurde das Zusammenlagern der mittels Vorkultur angezogenen Biomasse beobachtet. So konnte in Abbildung 4.83, B das Vorliegen eines kompakten Klumpens nach 7 d dokumentiert werden. Im Vergleich zur vorherigen Kultivierung wies der Klumpen allerdings eine geringere Größe auf. Somit konnte zumindest qualitativ eine reduzierte Zunahme der Biomasse dokumentiert werden.

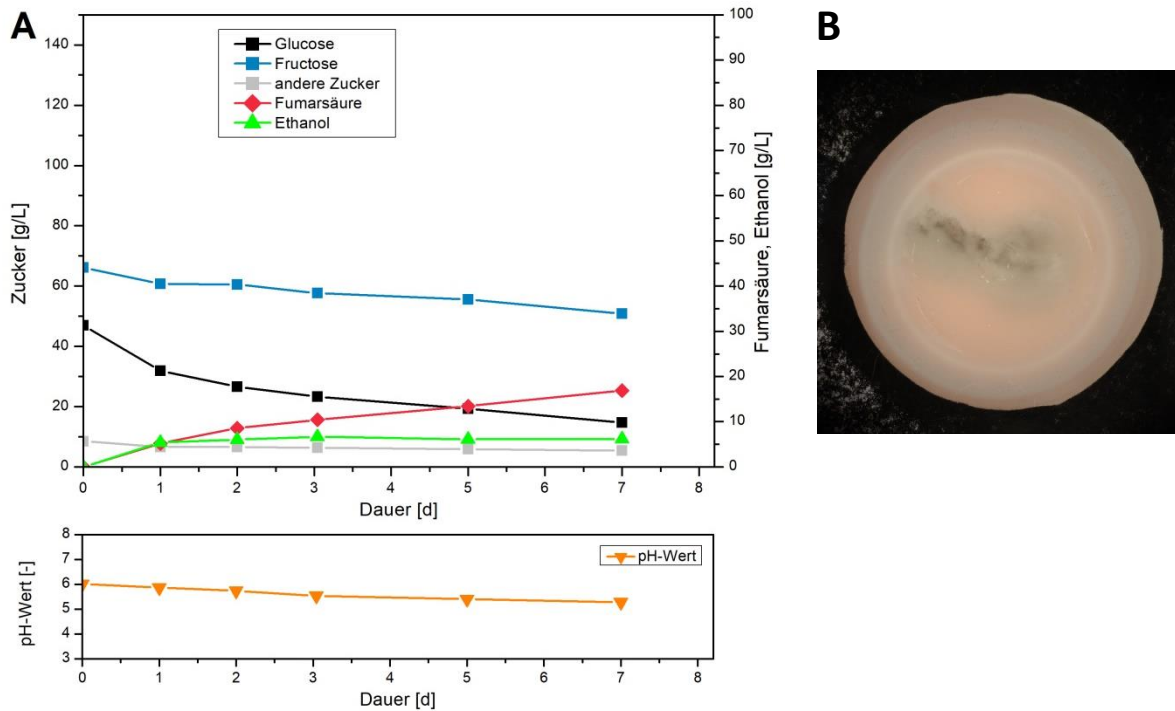


Abbildung 4.83: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit Vorkultur und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (inkl. Spurenelemente, 0,3 g/L KH_2PO_4 und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Zugabe) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR); A - Verlauf der Kultivierung, B - Aufnahme der Morphologie nach 7 d.

Dass im Kultivierungsansatz eine geringere Biomassekonzentration vorlag, konnte auch anhand des erzielten Kultivierungsverlaufs belegt werden, der eine deutlich reduzierte Verstoffwechslung der vorliegenden Zucker aufwies. So wurden nach 7 d lediglich 42 % der initial vorliegenden Zucker umgesetzt. Innerhalb der einzelnen Zuckerfraktionen wies Glucose die größte Verstoffwechslungsrate auf, die allerdings nach einer Kultivierungsdauer von einem Tag abnahm. Trotz des geringeren Zuckerumsatzes konnte eine um ca. 55 % gesteigerte Produktion von Fumarsäure festgestellt werden. So enthielt der Ansatz nach einer Kultivierungsdauer von 7 d eine Konzentration von 16,9 g/L Fumarsäure. Unter Berücksichtigung der hierfür umgesetzten Zucker entspricht dies einer Ausbeute von 0,33 g/g_{Zucker}, bei einer Gesamtproduktivität von 0,10 g/(L·h). Als weiterer Unterschied konnte eine deutlich reduzierte Bildung von Ethanol festgestellt werden. So wies der Kultivierungsansatz nach 3 d eine maximale Konzentration von lediglich 6,7 g/L Ethanol auf. Im Vergleich zur Kultivierung mit Apfeltrester-Saft und einer zusätzlichen Zugabe von 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde somit die gebildete Menge an Ethanol um 70 % reduziert.

Zusammenfassend konnte durch einen Verzicht der Zugabe von Ammonium die allgemeinen Produktionseigenschaften verbessert werden. Aufgrund der weiterhin vorliegenden Klumpen-Morphologie eignete sich die Kultivierungsstrategie mittels Vorkultur allerdings nicht für eine effektive Produktion von Fumarsäure auf Basis des aufgereinigten Apfeltrester-Safts. Daher wurde der Kultivierungsansatz mit Vorkultur nicht weiter verfolgt.

4.3.6 Kultivierung mit separater Biomasseproduktion und Apfeltrester-Saft

Da der Einsatz der zuvor beschriebenen Kultivierungsstrategie mit Vorkultur keine effektive Produktion von Fumarsäure ermöglichte, wurde im Rahmen dieses Kapitels die Kultivierungsstrategie mit separater Biomasseproduktion angewendet. Hierzu wurde analog zu Kapitel 4.1.7 zunächst mittels einer zweistufigen Vorkultur Biomasse in optimiertem Medium C und Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Die in Form von losem Mycel vorliegende Biomasse wurde anschließend vom Vorkulturmedium befreit, gewaschen und eingeeengt. In der Hauptkultur wurden 100 mL aufgereinigter Apfeltrester-Saft in einen 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen vorgelegt und mit den in optimierten Medium C enthaltenen Spurenelementen und 0,3 g/L KH_2PO_4 versetzt. Auf eine Zugabe von Ammonium, in Form von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, wurde verzichtet. Zur Regulierung des pH-Wertes wurden 50 g/L Calciumcarbonat verwendet. Das Animpfen dieses Kultivierungsansatzes erfolgte durch die Zugabe von 30 mL eingeeengter Biomassesuspension. Zu Beginn der Hauptkultur lag somit eine initiale Konzentration der Biotrockenmassen von 3,15 g/L (s. Kapitel 4.1.7.1) vor. Auf Grundlage dieses Vorgehens wurde in den folgenden Kapiteln das Produktionsverhalten von *R. arrhizus* NRRL 1526 und unterschiedlich stark aufkonzentriertem Apfeltrester-Saft genauer untersucht.

4.3.6.1 Kultivierung mit Apfeltrester-Saft und einer Zuckerkonzentration von 90 g/L

Durch die Zugabe der eingeeengten Biomassesuspension wurde die im Apfeltrester-Saft vorliegende Zuckerkonzentration um ca. 25 % verdünnt. So konnte bei der in diesem Kapitel beschriebenen Kultivierung eine initiale Gesamtkonzentration von 90 g/L Zuckern festgestellt werden. Die ursprüngliche Zuckerkonzentration des aufgereinigten Apfeltrester-Saft betrug hierbei ca. 120 g/L. Unter Anwendung der zuvor beschriebenen Vorgehensweise konnte der in Abbildung 4.84 dargestellte Verlauf der Hauptkultur dokumentiert werden.

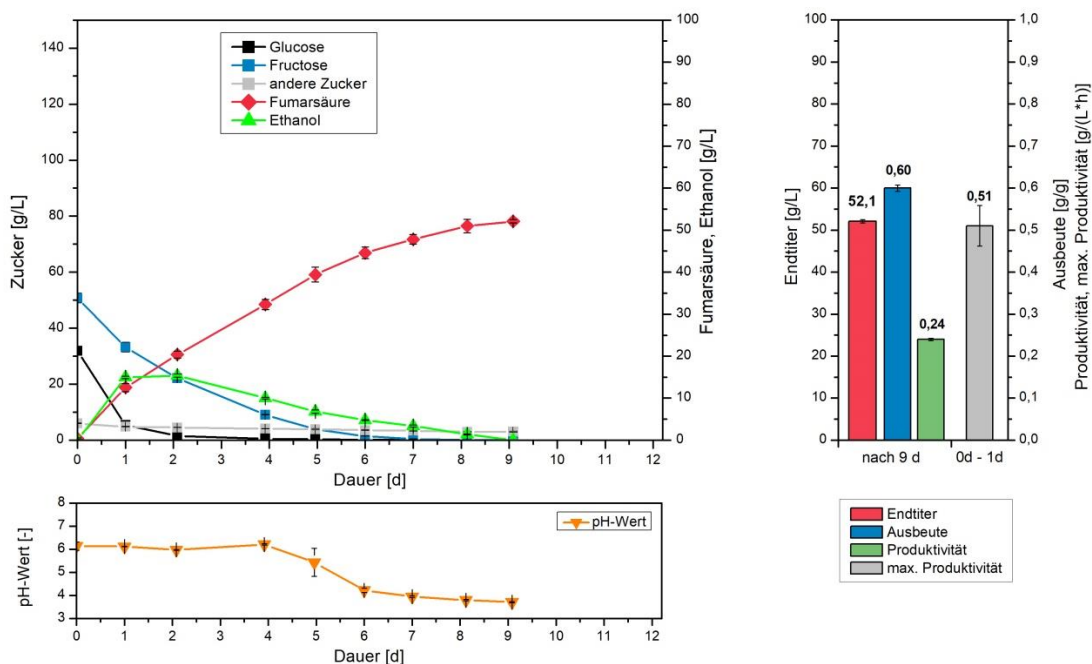


Abbildung 4.84: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (90 g/L Zucker, inkl. Spurenelemente, 0,3 g/L KH_2PO_4 und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Zugabe) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR).

Bezogen auf die spezifische Verstoffwechslung der einzelnen Zuckerfraktionen konnte bei dem Monosaccharid Glucose nach einer Kultivierungsdauer von 1 d die stärkste Abnahme beobachtet werden. Dagegen wiesen Fructose und vor allem die Summe aus sonstigen Zuckern eine reduzierte Verstoffwechslungsrate auf. Die bevorzugte Nutzung von Glucose spiegelte sich auch im weiteren Kultivierungsverlauf wieder. So lagen nach einer Kultivierungsdauer von 2 d noch 5 % der initialen Glucosekonzentration im Kultivierungsansatz vor. Im selben Zeitraum konnten dagegen lediglich 56 % der ursprünglich eingesetzten Fructose und 25 % der anderen Zucker verstoffwechselt werden. Vor allem Saccharose, das anteilig die größte Fraktion der anderen Zucker darstellte, konnte von *R. arrhizus* NRRL 1526 bei diesem Kultivierungsansatz nicht verstoffwechselt werden. So wurde im Gegensatz zu Glucose und Fructose kein vollständiges Aufbrauchen der anderen Zucker innerhalb des untersuchten Zeitraums detektiert. Der Einsatz von separat angezogener Biomasse ermöglichte somit innerhalb von 9 d die Verstoffwechslung von 97 % der initial vorliegenden Zucker. Hinsichtlich der Produktion von Fumarsäure konnte innerhalb des ersten Tages die maximale Produktivität von 0,51 g/(L·h) detektiert werden, die im weiteren Kultivierungsverlauf abnahm. So betrug die Gesamtproduktivität der Kultivierung 0,24 g/(L·h). Unter Berücksichtigung des Endtiters von 52,1 g/L Fumarsäure und der dafür umgesetzten Zucker konnte eine Gesamtausbeute von 0,60 g/g erzielt werden. Aufgrund der ansteigenden Konzentration an Fumarsäure kam es nach einer Kultivierungsdauer von 5 d zum vollständigen Aufbrauchen des eingesetzten Calciumcarbonats (50 g/L). Dies kann anhand eines abfallenden pH-Werts ab diesem Kultivierungszeitpunkt belegt werden.

Bezüglich der Produktion von Nebenprodukten ist anzumerken, dass durch das Vorliegen von anderen Zuckern über den gesamten Kultivierungsverlauf eine exakte Bestimmung der Konzentration an anderen organischen Säuren nicht möglich war. Dies ist begründet mit einer Überlagerung der entsprechenden HPLC-Signale, die in Kapitel 4.2.1 ausführlich beschrieben wurden. Das prinzipiell auch andere organische Säure (Äpfelsäure und Bernsteinsäure) gebildet wurden, konnte allerdings nachgewiesen werden. Ohne Abzug der Signalüberlagerung, durch die noch vorliegenden anderen Zucker, wurde nach 9 d eine Konzentration von 14,0 g/L an anderen organischen Säuren detektiert. Als weiteres Nebenprodukt konnte innerhalb des ersten Tages die Bildung von 15,0 g/L Ethanol festgestellt werden, die im weiteren Kultivierungsverlauf allerdings wieder vollständig abgebaut wurden. Die anfängliche Akkumulation von Ethanol kann hierbei auf eine zu geringe Sauerstoffversorgung der vorliegenden Biomasse zurückgeführt werden. In bisherigen Referenz-kultivierungen auf Basis von Glucose deutete die Bildung von Ethanol auf ein weiteres Biomassewachstum hin. So konnte in Kapitel 4.1.4, bei der wachstumsgekoppelte Produktion von Fumarsäure mittels Vorkultur, während der Kultivierungsphase mit der höchsten Zunahme an Biomasse, eine hohe Akkumulation von Ethanol festgestellt werden. Dagegen zeigte die in Kapitel 4.1.7 diskutierte wachstumsentkoppelte Fumarsäureproduktion keine Zunahme der Biomasse-konzentration auf und ermöglicht somit Kultivierungen bei einer fast vollständig vermiedenen Bildung von Ethanol. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache kann die hier dokumentierte Akkumulation von Ethanol auf eine mögliche Zunahme der Biomassekonzentration zurückgeführt werden. Da ein Wachstum von Biomasse nur unter Präsenz von verwertbarem Stickstoff möglich ist, deutet die hier aufgezeigte Bildung von Ethanol auf das mögliche Vorliegen einer nicht weiter untersuchten Stickstoffquelle in Apfeltrester-Saft hin.

Als weiterer indirekter Nachweis für das Wachstum von Biomasse kann die in Abbildung 4.85 dargestellte Morphologie angeführt werden. So wies die nach 5 d vorliegende Biomasse, neben

einzelnen Mycelflocken, auch stark agglomerierte Bereiche auf, die bisher bei einem vollständig unterbundenen Biomassewachstum nicht beobachtet werden konnten (vgl. Kapitel 4.1.7 und Kapitel 4.2.3). Im Gegensatz zur Kultivierungsstrategie mit Vorkultur und Apfeltrester-Saft konnte allerdings eine Klumpenbildung über den gesamten Kultivierungszeitraum erfolgreich verhindert werden (vgl. Kapitel 4.3.5). Somit stellt die hier erzielte Morphologie eine entscheidende Verbesserung dar, um auf Basis von aufgereinigtem Apfeltrester-Saft effektiv Fumarsäure zu produzieren.

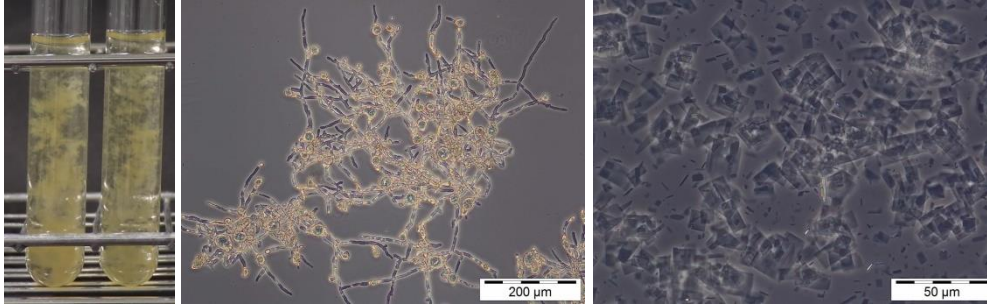


Abbildung 4.85: Morphologie bei der Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (90 g/L Zucker); A - makroskopische Aufnahme der Morphologie nach 5 d, B - mikroskopische Aufnahme des Myceliums nach 7 d, C - mikroskopische Aufnahme von Fumarsäurekristallen nach 7 d.

In Abbildung 4.85, C sind außerdem die bei dieser Kultivierung ausgefallenen Fumarsäurekristalle abgebildet. Im Gegensatz zu bisherigen Kultivierungen, die auf Basis von Glucose oder synthetischem Apfeltrester-Medium durchgeführt wurden, konnten keine nadelförmigen Kristallstrukturen nachgewiesen werden. Vielmehr treten nach dem Erreichen der Löslichkeitsgrenze von Fumarsäure rechteckige Blättchen im Kultivierungsansatz auf. Bezüglich möglicher Ursachen für die veränderte Kristallbildung wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Zur Einordnung des hier erzielten Kultivierungsergebnisses empfiehlt sich ein Vergleich mit der in Kapitel 4.2.3 durchgeführten Kultivierung auf Basis von synthetischem Apfeltrester-Medium. Da bei beiden Ansätzen die identische Kultivierungsstrategie mit separater Biomasseproduktion angewandt und eine vergleichbare Konzentration der einzelnen Zuckerfraktionen verwendet wurde, können Unterschiede direkt auf die Verwendung von real hergestelltem Apfeltrester-Saft zurückgeführt werden. So wurde bei beiden Kultivierungen ein vergleichbares Produktionsverhalten an Fumarsäure festgestellt, das nach einer anfänglich hohen Produktivität immer weiter abnahm. Zum jeweiligen Ende der Kultivierung wiesen beiden Ansätzen eine Fumarsäurekonzentration von ca. 50 g/L auf. Unterschiede zeigten sich dagegen bezüglich der erzielten Gesamtproduktivität und der Ausbeute. So wurde bei der hier beschriebenen Kultivierung mit Apfeltrester-Saft ein fast vollständiger Umsatz aller vorliegenden Zucker innerhalb von 9 d realisiert. Dies resultierte in einer Produktivität von 0,24 g/(L·h) und einer Ausbeute von 0,60 g/g. Dagegen konnten bei der Kultivierung mit synthetischem Apfeltrester-Medium eine deutlich reduzierte Verstoffwechslung der Zucker festgestellt werden, die keinen Vollumsatz nach 12 d ermöglichte. Als Resultat wurden zwar vergleichsweise weniger Zucker zur Produktion der gleichen Menge an Fumarsäure verwendet. Dies spiegelt sich in einer um ca. 35 % gesteigerten Ausbeute (0,82 g/g) wider. Da hierfür allerdings eine verhältnismäßig längere Kultivierungsdauer benötigt wurde, konnte bei der Kultivierung mit synthetischem Apfeltrester-Medium eine um ca. 30 % geringere Gesamtproduktivität von 0,17 g/(L·h) festgestellt werden.

Zusammenfassend ermöglichte der Einsatz von real hergestelltem Apfeltrester-Saft somit, unter einem akzeptablen Rückgang der Ausbeute, eine effektive Möglichkeit die in Apfeltrester enthaltenen Zucker zu Fumarsäure umzusetzen. Vor allem die im Vergleich zum Modellmedium erhöhte Verstoffwechselungsrate und die daraus resultierende gesteigerte Produktivität können als Vorteile angeführt werden.

4.3.6.2 Kultivierung mit Apfeltrester-Saft und einer Zuckerkonzentration von 150 g/L

Da bei der zuvor gezeigten Kultivierung die initial vorliegende Glucose und auch Fructose vollständig verstoffwechselt werden konnten, wurde in einer zweiten Kultivierung der Einfluss einer erhöhten initialen Zuckerkonzentration untersucht. Die dazu erforderliche zusätzliche Aufkonzentrierung erfolgte während der Herstellung der zuckerhaltigen Flüssigkeit und somit vor der Aufreinigung zu Apfeltrester-Saft. Nach der Zugabe der Biomassesuspension konnte im Kultivierungsansatz eine initiale Gesamtkonzentration von 150 g/L Zucker realisiert werden. Somit standen *R. arrhizus* NRRL 1526 eine Konzentration von 52,1 g/L Glucose, 89,2 g/L Fructose und 8,5 g/L sonstige Zucker zur Produktion von Fumarsäure zur Verfügung. Durch eine dreimalige Zugabe von jeweils 20 g/L Calciumcarbonat (nach 4, 6 und 8 d) wurde der pH-Wert über den gesamten Kultivierungszeitraum reguliert. Der dabei erzielte Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 4.86 dargestellt.

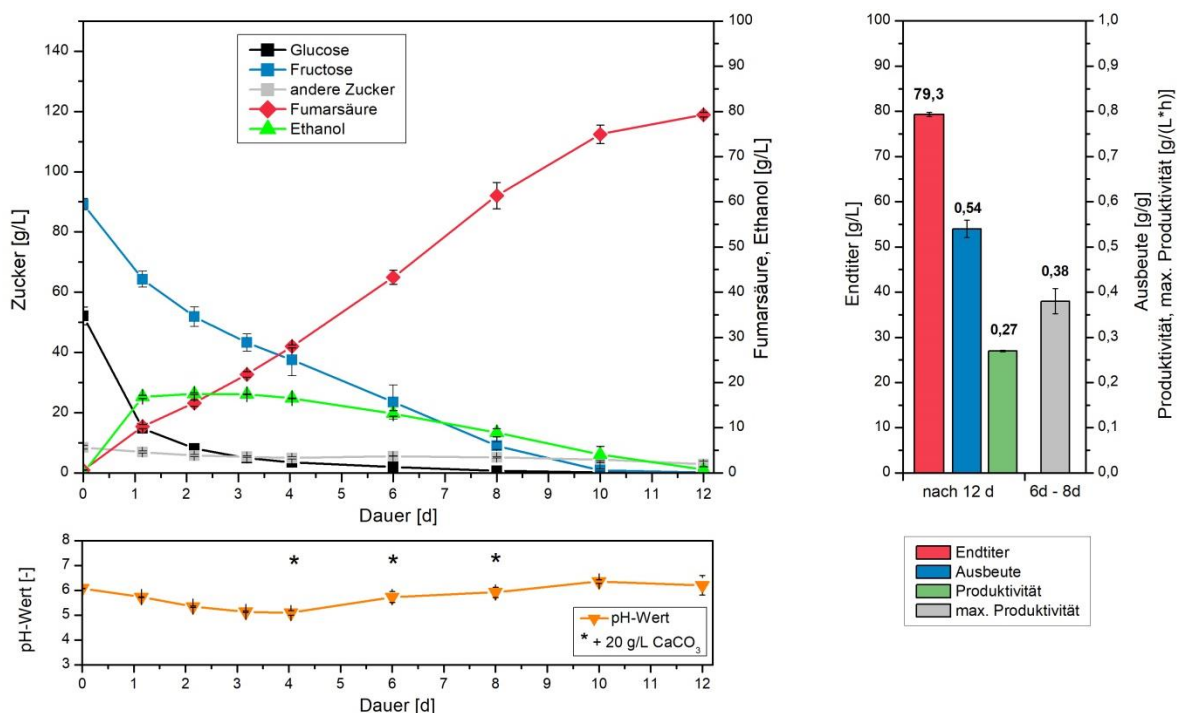


Abbildung 4.86: Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (150 g/L Zucker, inkl. Spurenelemente, 0,3 g/L KH_2PO_4 und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Zugabe) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO_3 (Typ 2 von VWR).

Durch die erhöhte initiale Zuckerkonzentration konnte die Kultivierungsdauer erfolgreich verlängert werden. So trat eine vollständige Verstoffwechselung von Glucose erst nach 8 d auf. In Bezug auf Fructose wurde nach 10 d ein vollständiger Umsatz festgestellt. Im Gegensatz dazu konnte auch bei dieser Kultivierung keine vollständige Nutzung von Saccharose detektiert werden. Somit lagen im

Kultivierungsansatz zum Ende der Kultivierung noch 35 % der ursprünglich eingesetzten anderen Zucker vor. Insgesamt konnte nach einer Kultivierungsdauer von 12 d 98 % aller initial vorliegenden Zucker verstoffwechselt werden. Somit wurde erfolgreich aufgezeigt, dass bei diesem Kultivierungsansatz auch die Verstoffwechslung von größeren Zuckermengen möglich ist. Insgesamt wurde bei diesem Kultivierungsansatz eine Konzentration von 79,3 g/L Fumarsäure nach 12 d nachgewiesen. Dies entspricht einer Gesamtproduktivität von 0,27 g/(L·h), bei einer Ausbeute von 0,54 g/g. Im Vergleich zur Kultivierung mit Apfeltrester-Saft und einer Zuckerkonzentration von 90 g/L konnte somit die Gesamtproduktivität um 13 % gesteigert werden. Dagegen wurde durch den Einsatz einer gesteigerten Zuckerkonzentration eine um 10 % geringere Ausbeute erzielt.

Bezogen auf die Bildung von Nebenprodukten konnte auch bei dieser Kultivierung ein hoher Anstieg der Ethanolkonzentration innerhalb des ersten Tages festgestellt werden. Die maximale Konzentration an Ethanol wurde hierbei nach 2 d detektiert. Mit 17,5 g/L Ethanol stellt dies nur eine geringe Steigerung im Vergleich zur Kultivierung mit einer geringeren initialen Zuckerkonzentration von 90 g/L Zucker dar. Somit konnte auch bei dieser Kultivierung das Auftreten einer zu geringen anfänglichen Sauerstoffversorgung der vorliegenden Biomasse aufgezeigt werden. Eine deutlich gesteigerte Akkumulation von Ethanol aufgrund der zusätzlichen Aufkonzentrierung des Apfeltrester-Saft konnte allerdings nicht festgestellt werden. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls die erzielte Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 anzuführen. Diese wies zu Beginn lose Mycelflocken auf, die untereinander keine Verknüpfungen aufwiesen (s. Abbildung 4.87, A). Mit fortschreitender Kultivierungsdauer bildeten sich dann vernetzte Mycelbereiche aus, die exemplarisch in Abbildung 4.87, B dargestellt sind. Somit konnte auch bei dieser Kultivierung eine Wachstumsform erzielt werden, die eine effektive Produktion von Fumarsäure ermöglichte.

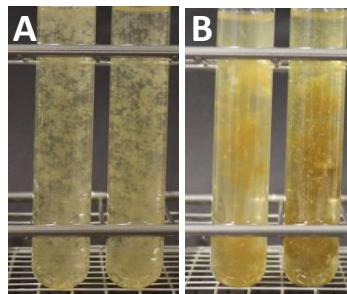


Abbildung 4.87: Morphologie bei der Kultivierung von *R. arrhizus* NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (150 g/L Zucker); A - makroskopische Aufnahme der Morphologie nach 1 d, B - Aufnahme der Morphologie nach 12 d.

Zusammenfassend konnte mit dem aufgereinigten Apfeltrester-Saft und einer hohen initialen Zuckerkonzentration von 150 g/L die Produktion von 79,3 g/L Fumarsäure realisiert werden. Dieses Ergebnis stellt den höchsten Endtiter an Fumarsäure dar, der im Rahmen dieser Arbeit auf Basis der in Apfeltrester enthaltenen Zucker erzielt werden konnte. Ein ausführlicher Vergleich dieses Ergebnisses mit weiteren Kultivierungen dieser Arbeit sowie eine Einordnung in den Kontext von Literaturangaben erfolgt in den folgenden Kapiteln (s. Kapitel 4.3.7 und Kapitel 4.3.9).

4.3.7 Zusammenfassung und Einordnung der Kultivierungsergebnisse

Auf Basis des aufgereinigten Apfeltrester-Safts wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Kultivierungsstrategien untersucht. Dabei ermöglichte der Einsatz der Vorkultur-strategie keine effektive Produktion von Fumarsäure. Als Ursache konnte die Ausbildung von Klumpen-Morphologie identifiziert werden, die selbst unter einem vollständigen Verzicht der Zugabe von wachstumsrelevantem Ammonium in der Hauptkultur nicht verhindert werden konnte. Somit kann eine Biokonversion von in Apfeltrester enthaltenen Zuckern zu Fumarsäure mittels Vorkulturstrategie ausgeschlossen werden. Dagegen konnte bei Anwendung der Kultivierungsstrategie mit separater Biomasseproduktion eine negative Zusammenlagerung der Biomasse erfolgreich verhindert werden. Die dabei erzielte Wachstumsform von *R. arrhizus* NRRL 1526 wies zwar keine ideale Mycel- bzw. Pellet-Morphologie auf, das Vorliegen von vernetzten Mycelagglomeraten reichte allerdings aus, um eine signifikante Konzentration an Fumarsäure zu produzieren. In Abhängigkeit von der initial eingesetzten Zuckerkonzentration konnten hierbei unterschiedliche Kultivierungsergebnisse erzielt werden. Zur besseren Veranschaulichung dieser Aussage und um diese Kultivierungsergebnisse in den Kontext dieser Arbeit einzuordnen, sind in Tabelle 4.9 Kultivierungen auf Basis unterschiedlicher Zuckerquellen vergleichend dargestellt. Bei allen Kultivierungen wurde die Kultivierungsstrategie mit separater Biomasseproduktion angewendet.

Tabelle 4.9: Vergleich der Kultivierungsergebnisse auf Basis unterschiedlicher Zuckerquellen, mit *R. arrhizus* NRRL 1526 und separater Biomasseproduktion in Schüttelkolben.

Kultivierung mit	Zuckerkonz. [g/L]	Verwertung [%]	Dauer [d]	Endtiter [g/L]	Ausbeute [g/g]	Produktivität [g/(L·h)]
Glucose	100	76	7	57,8	0,73	0,35
Fructose	100	69	12	46,4	0,67	0,16
synth. Apfeltrester-Med.	100	62	12	50,2	0,82	0,17
aufger. Apfeltrester-Saft	90	97	9	52,1	0,60	0,24
	150	98	12	79,3	0,54	0,27

Unter Einsatz des optimierten Mediums C und ohne Zugabe von Ammonium konnte bei wachstumsentkoppelten Kultivierungen mit Glucose, Fructose bzw. synthetischem Apfeltrester-Medium keine vollständige Verwertung der vorliegenden Zucker realisiert werden. Im Gegensatz hierzu konnte auf Basis des aufgereinigten Apfeltrester-Safts eine deutlich gesteigerte Verstoffwechselung der initial eingesetzten Zuckerkonzentration erzielt werden. Dies trifft auch auf den zusätzlich aufkonzentrierten Apfeltrester-Saft zu, der eine Gesamtkonzentration von 150 g/L Zucker aufwies. Als mögliche Ursache für den gesteigerten Nutzungsgrad an Zuckern konnten Anzeichen für ein zusätzliches Wachstum von *R. arrhizus* NRRL 1526 während der Kultivierung ausgemacht werden. Dies beinhaltete eine gesteigerte Bildung des Nebenprodukts Ethanol und eine Veränderung der Morphologie während der Kultivierung. Insgesamt wurde mit 79,3 g/L bei dieser Kultivierung der höchste Endtiter an Fumarsäure auf Basis von Apfeltrester-Saft dokumentiert.

Bezogen auf die Ausbeute an fermentativ hergestellter Fumarsäure konnte unter Einsatz des Modells substrats (synthetisches Apfeltrester-Medium) mit 0,82 g/g die höchste Ausbeute erzielt werden. Dagegen zeigten Kultivierungen unter Verwendung des real hergestellten Apfeltrester-Safts geringere Ausbeuten. In Abhängigkeit von der initial vorliegenden Zuckerkonzentration konnten Ausbeuten von 0,60 bzw. 0,54 g/g realisiert werden. Im Vergleich zur Modellkultivierung wurden somit um 27 % bzw. 34 % geringere Ausbeuten erzielt. Im Gegensatz hierzu konnte bezüglich der Produktivität eine gegenläufige Tendenz festgestellt werden. So ermöglichte die Verwendung von synthetischem Apfeltrester-Medium lediglich eine Gesamtproduktivität von 0,17 g/(L·h). Dagegen konnten mit aufgereinigtem Apfeltrester-Saft gesteigerte Produktivitäten von bis zu 0,27 g/(L·h) festgestellt werden. Geht man in diesem Zusammenhang von einer begünstigten Produktion von Fumarsäure aufgrund eines möglicherweise vorliegenden weiteren Biomassewachstums aus, so kann die hier aufgetretene Steigerung der Produktivität anhand dieser Tatsache erklärt werden.

Zusammenfassend verdeutlicht der hier angestellte Vergleich der Kultivierungsergebnisse, dass auch auf Basis der in Apfeltrester enthaltenen Zucker die fermentative Produktion von Fumarsäure möglich ist. Dabei stellt die Kultivierungsstrategie mit separater Biomasseproduktion einen vielversprechenden Ansatz dar, um die Morphologie von *R. arrhizus* NRRL 1526 zu kontrollieren und somit möglichst effektiv Fumarsäure zu produzieren.

4.3.8 Prozessüberblick: Fumarsäure aus Apfeltrester

Hinsichtlich einer stofflichen Bilanzierung der Herstellung von Fumarsäure auf Basis von Apfeltrester sind in Abbildung 4.88 alle notwendigen Prozessstufen schematisch dargestellt. Nach einer zusammenfassenden Erläuterung der einzelnen Prozessschritte erfolgt abschließend eine Bewertung des Gesamtprozesses.

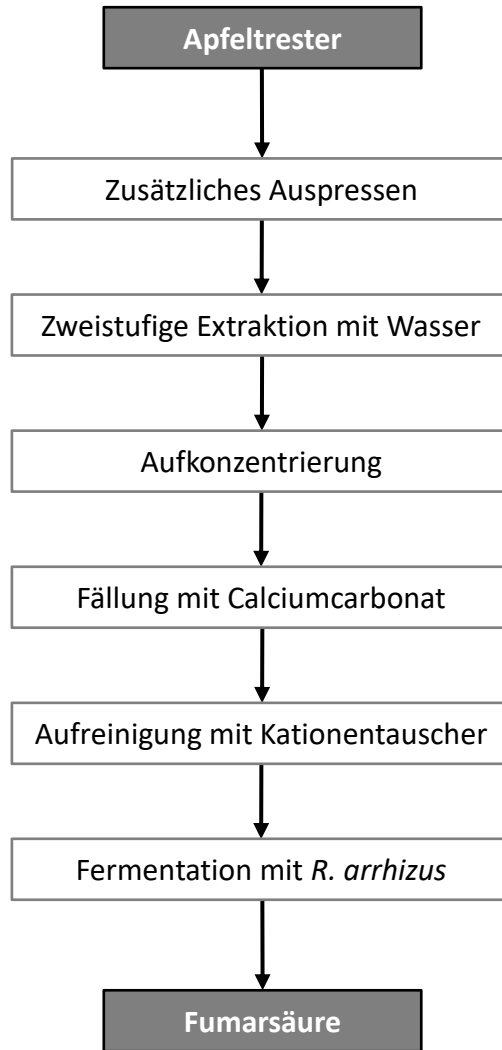


Abbildung 4.88: Schematische Darstellung des entwickelten Herstellungsprozesses von Fumarsäure auf Basis von Apfeltrester.

- Der Apfeltrester wurde zunächst mittels hydraulischer Packpresse bei 20 bar für 20 min gepresst. Dies ermöglichte eine Separierung von zuckerhaltigem Presssaft unter geringem Prozessaufwand.
- Die im ausgepressten Apfeltrester noch vorhandenen wasserlöslichen Zucker wurden mit einer zweistufigen Extraktion mit Wasser und anschließender Separierung mittels Pressung vom Restfeststoff abgetrennt. Hierzu wurde jeweils ein Extraktionsverhältnis von 2/1 (w/w, Apfeltrester/Wasser) verwendet. Durch die kombinierte Prozessführung von zusätzlichem Auspressen und zweistufiger Extraktion mit Wasser konnten insgesamt 69,9 g_{Zucker}/kg_{AT} in die zuckerhaltige Flüssigkeit überführt werden.

- Zur Aufkonzentrierung der vereinigten zuckerhaltigen Flüssigkeit wurde in einem offenen System bei einer Temperatur von 90 °C Wasser entzogen. Dies ermöglichte die Herstellung von zwei unterschiedlich stark aufkonzentrierten Flüssigkeiten, die in den entsprechenden Kultivierungen eine initiale Konzentration von 90 g/L bzw. 150 g/L Zucker erlaubte.
- Durch die Zugabe von 1 % (w/w) Calciumcarbonat konnten in der zuckerhaltigen Flüssigkeit enthaltene Trübstoffe ausgefällt und mittels Zentrifugation entfernt werden.
- Eine abschließende Aufreinigung der zuckerhaltigen Flüssigkeit erfolgte durch Verwendung einer Kationentauscher-Säule (Dowex 50WX8). Durch ein zweimaliges Durchleiten der zuckerhaltigen Flüssigkeit konnten weitere Trübstoffe entfernt und somit der aufgereinigte Apfeltrester-Saft gewonnen werden.
- Die Biokonversion, der in Apfeltrester-Saft enthaltenen Zucker zu Fumarsäure erfolgte mittels *R. arrhizus* NRRL 1526 und der Kultivierungsstrategie der separaten Biomasseproduktion. Da hierbei durch die Zugabe von Biomass suspension die Zuckerkonzentration des Apfeltrester-Safts verdünnt wurde, konnten initiale Konzentrationen von 90 g/L bzw. 150 g/L Zucker in den entsprechenden Kultivierungen realisiert werden. Die fermentative Umsetzung von 90 g/L Gesamtzucker ermöglichte hierbei innerhalb von 9 d die Produktion von 52,1 g/L Fumarsäure, bei einer Ausbeute von 0,60 g/g und einer Produktivität von 0,24 g/(L·h). Bei einer initialen Zuckerkonzentration von 150 g/L konnten in 12 d dagegen 79,3 g/L Fumarsäure, bei einer reduzierten Ausbeute von 0,54 g/g und einer leicht gesteigerten Produktivität von 0,27 g/(L·h) produziert werden.

Unter Anwendung des hier aufgezeigten Prozesses war es somit möglich die in Apfeltrester enthaltenen Zucker für die fermentative Produktion von Fumarsäure nutzbar zu machen. Hinsichtlich der erforderlichen Menge an Apfeltrester zur Herstellung von 1 kg_{Fumarsäure} können zwei Bilanzierungen angestellt werden. So wurden bei der Fermentation mit einer initialen Zuckerkonzentration von 150 g/L insgesamt 1,85 kg_{Zucker} zur Herstellung von 1 kg_{Fumarsäure} benötigt. Unter Berücksichtigung der Zuckerausbeute bei der Herstellung des Apfeltrester-Safts entspricht dies einem Bedarf von 26,5 kg_{Apfeltrester} zur Produktion von 1 kg_{Fumarsäure}. Aufgrund einer erhöhten Kultivierungsausbeute bei einer initialen Zuckerkonzentration von 90 g/L wurden dagegen bei diesem Prozess nur 23,8 kg_{Apfeltrester}/kg_{Fumarsäure} benötigt. Bezogen auf diesen Prozessparameter konnte somit auf Grundlage der Kultivierung mit einer geringeren Zuckerkonzentration ein reduzierter Bedarf an Apfeltrester festgestellt werden. Da allerdings bei der Kultivierung mit einer initialen Konzentration von 150 g/L eine höhere Produktivität und das Vorliegen einer höheren Endkonzentration an Fumarsäure nachgewiesen wurde, weisen beide Kultivierungsansätze spezifische Unterschiede auf, die bei einer prinzipiellen Bewertung des Gesamtprozesses berücksichtigt werden müssen.

4.3.9 Vergleich mit der Literatur

Bei einem Vergleich der hier erzielten Kultivierungsergebnisse mit Literaturangaben ist prinzipiell zu beachten, dass die Nutzung von in Apfeltrester enthaltenen Zuckern zur fermentativen Herstellung von Fumarsäure eine sehr spezifische Kombination zweier einzelner Prozessschritte darstellt. So konnte in bisherigen Publikationen keine vergleichbare Prozessführung gefunden werden, die zunächst die in Apfeltrester enthaltenen Zucker separiert und diese anschließend in einer Fermentation zu Fumarsäure umsetzt. Ein Vergleich der hier erzielten Kultivierungsergebnisse mit der Literatur ist somit nur eingeschränkt möglich.

Mit Das et al. (2015a) konnte allerdings eine Publikation gefunden werden, die sich ebenfalls mit der Produktion von Fumarsäure befasst und hierzu einen alternativen Reststoff verwendet, der bei der Herstellung von Apfelsaft anfällt. Es handelt sich hierbei um ein feststoffreiches Ultrafiltrat, das beim Klären von naturtrüben Apfelsaft mittels Ultrafiltration anfällt. Unter Verwendung dieser zuckerreichen Substanz konnte mit *R. arrhizus* NRRL 1526 eine Schüttelkolbenkultivierung durchgeführt werden, die die Produktion von 25,2 g/L Fumarsäure, bei einer Produktivität von 0,35 g/(L·h), ermöglichte. Unter Ausbildung von Pellet-Morphologie konnte somit im Vergleich zu Kultivierungen dieser Arbeit eine leicht erhöhte Produktivität erzielt werden. Bezüglich des Endtiters zeigen allerdings Kultivierungen dieser Arbeit eine deutlich gesteigerte finale Konzentration an Fumarsäure auf. Da in Das et al. (2015) keine Informationen zur absolut vorliegenden Zuckermenge enthalten sind, ist eine abschließende Bewertung, unter Berücksichtigung der erzielten Ausbeute, nicht möglich.

Neben dieser Publikation konnten weitere Veröffentlichungen gefunden werden, die sich mit der fermentativen Produktion von Fumarsäure beschäftigen. Hierfür wurden allerdings andere nachwachsende Reststoffe als Kohlenstoffquelle verwenden. Formal können diese in lignocellulosehaltige und stärkebasierte Reststoffe bzw. eine Mischform von beiden unterteilt werden (Xu et al., 2012).

So wurde beispielsweise in Xu et al. (2010) auf Basis von Weizenstroh, mittels einer Säurevorbehandlung und anschließender enzymatischen Hydrolyse, ein Hydrolysat mit einer Zuckerkonzentration von 80 g/L hergestellt. In der anschließenden Fermentation konnte eine finale Konzentration von 27,8 g/L Fumarsäure, bei einer Ausbeute von 0,35 g/g und einer Produktivität von 0,33 g/(L·h) erzielt werden. Ergänzend ist anzumerken, dass bei dieser Publikation bereits die Anzucht der verwendeten *Rhizopus* sp. mittels in Weizenstroh enthaltener Xylose erfolgte. Die hier beschriebene Kultivierungsstrategie ermöglichte somit die Produktion von Fumarsäure ohne den Einsatz zusätzlich hinzugegebener Zucker während der Anzucht von Biomasse. Im Gegensatz dazu wurde in Wu et al. (2018) die verwendete *Rhizopus* sp. zunächst mittels PDA-Medium angezogen. Als Zuckerquelle der darauf folgenden Hauptkultur wurde ein aufgereinigtes und aufkonzentriertes Hydrolysat mit einer Zuckerkonzentration von 125 g/L (100 g/L Glucose und 25 g/L Xylose) verwendet. Das Hydrolysat basiert auf Resten von Maiskolben, die mittels Säurevorbehandlung und enzymatischer Hydrolyse monomerisiert wurden. Insgesamt konnte bei der Fermentation ein Endtiter von 49,1 g/L Fumarsäure, bei einer Ausbeute von 0,45 g/g und einer Produktivität von 0,41 g/(L·h) erzielt werden. Bei diesem Kultivierungsergebnis handelt es sich um den höchsten Endtiter an Fumarsäure, der nach aktuellem Wissensstand, auf Basis eines nachwachsenden Reststoffs erzielt wurde. Vergleicht man nun dieses Ergebnis mit den in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen, so konnte auf Basis des aufgereinigten

Apfeltrester-Safts eine gesteigerte Ausbeute erzielt werden. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Zuckermenge resultiert dies in einem um 6 % (90 g/L initiale Zuckerkonzentration) bzw. 62 % (150 g/L initiale Zuckerkonzentration) erhöhtem Endtiter an Fumarsäure. Einschränkend ist zu erwähnen, dass bei Kultivierungen mit Apfeltrester-Saft, im Vergleich zur Kultivierung mit Maiskolben-Hydrolysat, eine geringere Produktivität erzielt wurde.

Dass auch auf Basis von stärkebasierten Reststoffen eine Produktion von Fumarsäure möglich ist, konnte beispielsweise in Liu et al. (2016) nachgewiesen werden. In dieser Publikation wurde eine zuckerhaltige Flüssigkeit verwendet, die aus Lebensmittelabfällen hergestellt wurde. Dabei konnte in Schüttelkolbenkultivierungen mit einer *Rhizopus* sp. 32,7 g/L Fumarsäure, bei einer Produktivität von 0,34 g/(L·h), produziert werden. Fehlende Angaben zur umgesetzten Zuckermenge verhindern allerdings eine Aussage bezüglich der Ausbeute dieses Prozesses. Als weitere Veröffentlichung, die sich mit der Fumarsäureproduktion auf Basis eines stärkebasierten Rohstoffs beschäftigt, kann Moresi et al. (1991) angeführt werden. In dieser Publikation wurde Kartoffelstärke eingesetzt, um eine initialen Zuckerkonzentration von 75 g/L zu realisieren. Die fermentative Umsetzung dieser Zuckermenge mit *R. arrhizus* NRRL 1526 ermöglichte einen Endtiter von 44,0 g/L Fumarsäure innerhalb von 5,8 d. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,59 g/g und einer Produktivität von 0,31 g/(L·h). Bezüglich dieser beiden Prozessgrößen konnte somit mit Moresi et al. (1991) eine Publikation gefunden werden, die ein vergleichbares Produktionsverhalten auf Basis eines alternativen nachwachsenden Substrats beschreibt.

Zusammenfassend konnte anhand des Literaturvergleichs festgestellt werden, dass prinzipiell eine Vielzahl unterschiedlicher nachwachsender Reststoffe für die biotechnologische Produktion von Fumarsäure verwendet werden kann. Bezogen auf die dabei erzielten Produktivitäten konnte im Rahmen dieser Arbeit eine leicht geringere Produktivität (0,24 g/(L·h) bzw. 0,27 g/(L·h)) festgestellt werden. Bezüglich dieser Prozessgröße weist die verwendete Kultivierungsstrategie mit separater Biomasseproduktion und Apfeltrester-Saft als Kohlenstoffquelle noch Optimierungspotenzial auf. Dagegen können die in dieser Arbeit erzielten Ausbeuten von 0,60 g/g bzw. 0,54 g/g im oberen Bereich von publizierten Kultivierungsergebnissen eingeordnet werden. Als Alleinstellungsmerkmal dieser Arbeit können die hier erzielten hohen Endtiter von 52,1 g/L bzw. 79,3 g/L Fumarsäure angeführt werden. So konnte keine weitere Publikation gefunden werden, die auf Basis eines nachwachsenden Reststoffs eine höhere Endkonzentration an Fumarsäure erreicht. Diese Feststellung bestätigt das hohe Potenzial der hier verwendeten Kultivierungsstrategie zur Produktion von Fumarsäure auf Basis eines agrarischen Reststoffs.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die aktuell ausschließlich petrochemisch produzierte Chemikalie Fumarsäure weist ein hohes Potenzial auf, auch mittels biotechnologischer Verfahren hergestellt zu werden. Hierfür ist die Entwicklung eines Fermentationsprozesses notwendig, der eine gezielte Morphologie-Kontrolle des verwendeten Produktionsstamms zulässt und gleichzeitig eine effektive Produktion von Fumarsäure ermöglicht. Des Weiteren ist es empfehlenswert, für diesen Prozess einen nachwachsenden agrarischen Reststoff als Substratquelle zu verwenden, um eine direkte Konkurrenz zur Lebensmittelindustrie zu vermeiden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierzu zunächst auf Basis des Substrats Glucose und mit dem Produktionsstamms *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 insgesamt drei unterschiedliche Fermentationsstrategien entwickelt und das jeweilige Produktionsverhalten charakterisiert. Als Vorlage diente hierbei das patentierte Kultivierungsverfahren von Ling und Ng (1989). Ausgehend von dieser Prozessvorschrift konnte im Schüttelkolbenmaßstab eine erste Kultivierungsstrategie entwickelt werden, die aus einer direkten Sporeninokulation der Hauptkultur bestand. Durch den Verzicht einer Vorkultur konnte ein deutlich vereinfachter Prozess untersucht werden, der eine gezielte Medien- und Prozessoptimierung zuließ. Dabei konnten bedeutende Erkenntnisse bezüglich der Morphologie-Kontrolle gewonnen werden. So ermöglichte beispielsweise die Verwendung von Calciumcarbonat mit einer geringeren Partikelgröße, das zur Regulierung des pH-Werts eingesetzt wurde, die Ausbildung von einzelnen Mycelflocken, anstelle der ungeeigneten Klumpen-Morphologie oder dem Wachstum in Form von großen und kompakten Pellets. Außerdem konnte im Rahmen der Medienoptimierung durch eine Variation des verwendeten C/N-Verhältnisses ein kritisches Minimum von ca. 90 gC/g_N identifiziert werden, das zur Vermeidung von Klumpen nicht unterschritten werden sollte. Abweichend zum Ausgangspunkt enthielt das optimierte Fermentationsmedium keine Komplexmedienbestandteile wie Maisquellwasser oder Hefeextrakt, auf den Einsatz von Weinsäure wurde ebenfalls verzichtet und es wurde eine reduzierte Konzentration an wachstumsrelevantem Ammoniumsulfat verwendet. Für die folgenden Kultivierungsstrategien wurde dieses optimierte Medium sowohl in entsprechenden Vorkulturen als auch Hauptkulturen eingesetzt.

Bei der zweiten Kultivierungsstrategie wurde das Auskeimen der Sporen und somit die erste Anzucht von Biomasse in einer Vorkultur durchgeführt. Dadurch konnte im Gegensatz zur Kultivierung mit direkt Sporeninokulation das Auftreten einer lag-Phase erfolgreich in die Vorkultur ausgelagert werden. Dies wirkte sich positiv auf die Gesamtbilanz des Herstellungsprozesses aus und resultierte in einem Endtiter von 86,3 g/L Fumarsäure, bei einer Ausbeute von 0,67 g/g und einer Gesamtproduktivität von 0,60 g/(L·h). Des Weiteren ermöglichte die Ausbildung von kompakten und

stabilen Mycelflocken einen Transfer dieser Kultivierungsstrategie in einen 1 L Bioreaktor. Durch die Möglichkeit einer aktiven Begasung konnte hierbei unter Ausbildung von kleinen Pellets eine bemerkenswert hohe maximale Produktivität von 1,28 g/(L·h) innerhalb der ersten 24 h der Hauptkultur nachgewiesen werden. Die Gesamtproduktivität betrug nach 4 d und der vollständigen Verstoffwechslung des Substrats 0,87 g/(L·h). Im Vergleich zur entsprechenden Schüttelkolbenkultivierung entspricht dies einer Steigerung der Gesamtproduktivität um 45 %. Neben dem hohen Potenzial eines Upscalings wurde im Schüttelkolbenmaßstab außerdem die maximal mögliche Endkonzentration an Fumarsäure bestimmt. Hierzu wurde die Kultivierungsstrategie modifiziert und durch Zugabe von zusätzlicher Glucose und Ammonium während der Hauptkultur erweitert. In Abhängigkeit von der absolut eingesetzten Menge an Substrat konnte die Produktionsphase erfolgreich auf eine Dauer von 11 d bzw. 15 d verlängert werden. Dadurch konnte eine Endkonzentration an Fumarsäure von 158,5 g/L bzw. 195,4 g/L erzielt werden. Bei diesen Werten handelt es sich um die mit Abstand höchsten fermentativ erzielten Endkonzentrationen an Fumarsäure, die nach aktuellem Wissensstand publiziert wurden.

Bezüglich einer weiteren Optimierung der Kultivierungsstrategie mit Vorkultur lieferte die Verwendung des aktiv begasbaren Bioreaktors einen vielversprechenden Ansatz, um die Effektivität der Fumarsäureproduktion weiter zu steigern. Perspektivisch besteht vor allem in einer systematischen Charakterisierung und Optimierung dieses Kultivierungssystems ein sehr hohes Potenzial. Beispiele für mögliche Optimierungsansätze sind unter anderem eine gesteigerte Sauerstoffversorgung der vorliegenden Biomasse durch eine Erhöhung der Begasungsrate oder die Verwendung einer alternativen pH-Regulierung. So könnte durch einen online-regulierten Basen-Feed, mit beispielsweise Natriumcarbonat, auf eine Zugabe des Feststoffs Calciumcarbonat verzichtet werden. Neben einer geringeren Viskosität des Kultivierungsansatzes würde hierbei außerdem gut wasserlösliches Natriumfumarat gebildet werden, das eine erleichterte Separierung und Aufreinigung des Endprodukts ermöglicht. Nach der Optimierung des Reaktorsystems wäre ein Upscaling der modifizierten Kultivierungsstrategie mit zusätzlicher Zugabe von Glucose und Ammonium ein sehr interessanter Ansatz. Könnte hierbei das Erzielen von hohen Endkonzentrationen an Fumarsäure mit der hohen Produktivität bei Reaktorkultivierungen gekoppelt werden, würde dies die Effektivität des Herstellungsprozesses deutlich verbessern.

Neben den beiden wachstums-assoziierten Kultivierungsstrategien wurde eine dritte Strategie entwickelt, die eine vollständig wachstumsentkoppelte Produktion von Fumarsäure ermöglichte. Hierzu wurde zunächst in einer zweistufigen Vorkultur Biomasse angezogen, diese anschließend gewaschen und in einem Fermentationsmedium ohne eine weitere Stickstoffquelle eingesetzt. Unter einer nachteiligen Abnahme der Gesamtproduktivität wurde hierbei auf Basis von Glucose eine Steigerung der Ausbeute auf 0,73 g/g festgestellt. Somit konnte durch das Erzielen einer Ausbeuten von > 0,64 g/g eindeutig nachgewiesen werden, dass bei der Akkumulation von Fumarsäure auch anteilig der Stoffwechselweg der reduktiven Carboxylierung aktiv sein muss. Außerdem ermöglichte die Ausbildung einer sehr robusten Mycel-Morphologie eine systematische Untersuchung des Einsatzes von alternativen Zuckern und lies somit eine Abschätzung der prinzipiellen Verwendung von agrarischen Reststoffen zu. So konnte durch den Einsatz von Xylose bzw. einer Mischung aus Xylose und Glucose als Substratquelle die Verwendung von ausschließlich lignocellulosehaltiger Biomasse ausgeschlossen werden. Dagegen wies der Stamm *R. arrhizus* NRRL 1526 ein erhöhtes Potenzial auf, das

Monosaccharid Fructose zu Fumarsäure umzusetzen. Vor allem der Einsatz eines synthetischen Apfeltrester-Mediums, das primär aus den Monosacchariden Fructose und Glucose bestand, zeigte mit einer erzielten Ausbeute von 0,82 g/g auf, dass die in Apfeltrester enthaltenen Zucker für eine Biokonversion geeignet sind. Bei der in diesem Kultivierungsansatz erzielten Ausbeute handelt es sich um die höchste Ausbeute, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt werden konnte.

Um das Potenzial einer biotechnologischen Herstellung von Fumarsäure auf Basis eines agrarischen Reststoffs zu untersuchen, wurde Apfeltrester als Ausgangssubstrat verwendet. Vorbereitend hierzu konnte Apfeltrester als zuckerreiches Substrat charakterisiert werden, das neben strukturell in Cellulose und Hemicellulose gebundenen Polysacchariden auch eine große Menge an wasserlöslichen Fruchtzuckern enthielt. Bezogen auf die Biotrockenmasse belief sich der Anteil an Sacchariden auf 66,5 % (w/w), wobei Glucose gefolgt von Fructose die größten Zuckerfraktionen darstellten. Unter Berücksichtigung der noch vorliegenden Restfeuchte enthielt der in dieser Arbeit verwendete Apfeltrester einen Zuckeranteil von 17,4 % (w/w). Zur Biokonversion dieser Zucker wurden zwei unterschiedliche Prozessstrategien untersucht. Der Einsatz einer simultanen Verzuckerung und Fermentation ermöglichte hierbei keine zufriedenstellende Produktion von Fumarsäure. Als mögliche Ursache konnte eine zu hohe Viskosität des Kultivierungsansatzes identifiziert werden, die in einer zu geringen Sauerstoffversorgung des Pilzes resultierte. Daher wurde in einer zweiten Prozessstrategie zunächst eine zuckerhaltige Flüssigkeit auf Basis des Apfeltresters hergestellt und somit ein feststofffreier Einsatz der Saccharide ermöglicht. Die Auswahl des Herstellungsverfahrens der zuckerhaltigen Flüssigkeit erfolgte unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten, wobei eine gekoppelte Prozessstrategie aus zusätzlichem Auspressen des Apfeltresters, gefolgt von einer zweistufigen Extraktion der wasserlöslichen Zucker, das beste Ergebnis lieferte. Die auf diese Weise gewonnene zuckerhaltige Flüssigkeit wurde anschließend durch eine Fällung mittels Calciumcarbonat und Verwendung eines Kationentauschers aufgereinigt. Auf Basis des aufgereinigten Apfeltrester-Safts und unter Verwendung der dritten Kultivierungsstrategie mit separater Biomasseproduktion konnte erfolgreich eine Fermentation zur Produktion von Fumarsäure durchgeführt werden. Dabei wurde unter Ausbildung von Mycel-Morphologie und in Abhängigkeit der eingesetzten Zucker-konzentrationen ein Endtiter an Fumarsäure von bis zu 79,3 g/L erzielt. Nach aktuellem Wissenstand handelt es sich bei diesem Ergebnis um die höchste Fumarsäurekonzentration, die auf Basis eines agrarischen Reststoffs hergestellt werden konnte.

Somit konnte sowohl auf Basis von Glucose als auch mit dem agrarischen Reststoff Apfeltrester erfolgreich aufgezeigt werden, dass eine effektive Fumarsäureproduktion mittels Biokonversion möglich ist. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Ansätze und Prozessstrategien stellen daher vielversprechende Grundlage dar, um eine nachhaltige und umweltfreundliche Produktion von Fumarsäure in einem industriell relevanten Maßstab zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

- Abe, A., Y. Oda, K. Asano and T. Sone (2007). "*Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers." *Mycologia* 99(5): 714-722.
- Anders, N. (2014). "Hydrolyse von agrarischen Rest- und Rohstoffen - Katalysatorscreening für die Verzuckerung von Weizenkaff." *Doktorarbeit*, Technische Universität Braunschweig.
- Åkerberg, C. and G. Zacchi (2000). "An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour." *Bioresource Technology* 75(2): 119-126.
- Albersheim, P., A. Darvill, K. Roberts, R. Sederoff and A. Staehelin (2010). "The structural polysaccharides of the cell wall and how they are studied." *Plant cell walls* 2: 43-66.
- Alfani, F., A. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera and M. Cantarella (2000). "Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25(4): 184-192.
- Alfaro-Gutiérrez, I. C., M. G. Guerra-Sánchez, A. N. Hernández-Lauzardo and M. G. Velázquez-del Valle (2014). "Morphological and physiological changes on *Rhizopus stolonifer* by effect of chitosan, oligochitosan or essential oils." *Journal of Phytopathology* 162(11-12): 723-730.
- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros and M. Negro (2010). "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review." *Bioresource Technology* 101(13): 4851-4861.
- Beltmann, H. and W. Pilnik (1971). "Die Kramer'sche Scherpresse als Laboratorums-Pressvorrichtung und Ergebnisse von Versuchen mit Äpfeln." *Confructa* 16(1): 4-9.
- Bornscheuer, U., K. Buchholz and J. Seibel (2014). "Enzymatischer Abbau von (Ligno) Cellulose." *Angewandte Chemie* 126(41): 11054-11073.
- Bulut, S., M. Elibol and D. Ozer (2004). "Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*." *Biochemical Engineering Journal* 21(1): 33-37.
- Byrne, G. S. and O. P. Ward (1989). "Growth of *Rhizopus arrhizus* in fermentation media." *Journal of Industrial Microbiology* 4(2): 155-161.
- Caffall, K. H. and D. Mohnen (2009). "The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides." *Carbohydrate research* 344(14): 1879-1900.

- Canilha, L., A. K. Chandel, T. Suzane dos Santos Milessi, F. A. F. Antunes, W. Luiz da Costa Freitas, M. das Graças Almeida Felipe and S. S. da Silva (2012). "Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation." *Journal of Biomedicine and Biotechnology*: 1-15.
- Cao, N., J. Du, C. Gong and G. Tsao (1996). "Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column." *Applied and Environmental Microbiology* 62(8): 2926-2931.
- Cao, N., J. Du, C. Chen, C. S. Gong and G. T. Tsao (1997). "Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus* using rotary biofilm contactor." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63(1): 387-394.
- Cargnin, S. T. and S. B. Gnoatto (2017). "Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: a valuable triterpenoid with functional properties." *Food Chemistry* 220: 477-489.
- Carta, F., C. Soccol, L. Ramos and J. Fontana (1999). "Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse." *Bioresource Technology* 68(1): 23-28.
- Dadi, A. P., S. Varanasi and C. A. Schall (2006). "Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step." *Biotechnology and Bioengineering* 95(5): 904-910.
- Das, R. K., S. K. Brar and M. Verma (2015a). "A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* 1526 utilizing apple industry waste biomass." *Fungal Biology* 119(12): 1279-1290.
- Das, R. K., S. K. Brar and M. Verma (2015b). "Valorization of egg shell biowaste and brewery wastewater for the enhanced production of fumaric acid." *Waste and Biomass Valorization* 6(4): 535-546.
- Das, R. K., S. K. Brar and M. Verma (2016a). "Chapter 8 - Fumaric acid: production and application aspects." *Platform Chemical Biorefinery*: 133-157.
- Das, R. K., S. K. Brar and M. Verma (2016b). "Application of calcium carbonate nanoparticles and microwave irradiation in submerged fermentation production and recovery of fumaric acid: a novel approach." *RSC Advances* 6(31): 25829-25836.
- Ding, Y., S. Li, C. Dou, Y. Yu and H. Huang (2011). "Production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*: role of carbon–nitrogen ratio." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164(8): 1461-1467.
- "DZMS - *Rhizopus delemar* DSM 905." retrieved from <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-905> (06.02.2019).
- Eidt, L. (2015). "Enzymatische Hydrolyse von agrarischen Reststoffen zur biotechnologischen Produktion von Itaconsäure." *Masterarbeit*, Technische Universität Braunschweig.
- El Ghaouth, A., J. Arul, A. Asselin and N. Benhamou (1992). "Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*." *Mycological Research* 96(9): 769-779.
- Felthouse, T. R., J. C. Burnett, B. Horrell, M. J. Mummey and Y. J. Kuo (2000). "Maleic anhydride, maleic acid, and fumaric acid." *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.

- Feng, X., H. Wang, Y. Wang, X. Wang and J. Huang (2010). "Biohydrogen production from apple pomace by anaerobic fermentation with river sludge." *International Journal of Hydrogen Energy* 35(7): 3058-3064.
- Foster, J. W. and S. A. Waksman (1939). "The production of fumaric acid by molds belonging to the genus *Rhizopus*." *Journal of the American Chemical Society* 61(1): 127-135.
- Fu, Y., Q. Xu, S. Li, H. Huang and Y. Chen (2009). "A novel multi-stage preculture strategy of *Rhizopus oryzae* ME-F12 for fumaric acid production in a stirred-tank reactor." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(10): 1871-1876.
- Fu, Y.-Q., S. Li, Y. Chen, Q. Xu, H. Huang and X.-Y. Sheng (2010). "Enhancement of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using a two-stage dissolved oxygen control strategy." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(4): 1031-1038.
- "Fumaric acid market size, share | Global industry analysis report, 2020." retrieved from <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/fumaric-acid-market> (23.08.2018).
- Gangl, I. C., W. A. Weigand and F. A. Keller (1990). "Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production by *Rhizopus arrhizus*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24-25(1): 663-677.
- Gassara, F., S. Brar, F. Pelletier, M. Verma, S. Godbout and R. Tyagi (2011). "Pomace waste management scenarios in Québec-impact on greenhouse gas emissions." *Journal of hazardous Materials* 192(3): 1178-1185.
- Ghose, T. K. (1987). "Measurement of cellulase activities." *Pure and Applied Chemistry* 59: 257-268.
- Goldberg, I. and B. Stieglitz (1986). "Fermentation process for production of carboxylic acids." US Patent 4,564,594 (to E. I. Du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Del.).
- Goldberg, I., J. S. Rokem and O. Pines (2006). "Organic acids: old metabolites, new themes." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81(10): 1601-1611.
- Gregg, D., A. Boussaid and J. Saddler (1998). "Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle." *Bioresource Technology* 63(1): 7-12.
- Gu, S., Q. Xu, H. Huang and S. Li (2014). "Alternative respiration and fumaric acid production of *Rhizopus oryzae*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(11): 5145-5152.
- Hajduk, F. A., X. Ma and L. Zeng (2014). "Chemical economics handbook - fumaric acid." *IHS Chemical*.
- Heitlinger, K. (2015). "Rahmendaten Tresterverwertung in der deutschen Fruchtsaft-Industrie." *Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V.*
- Hendriks, A. and G. Zeeman (2009). "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology* 100(1): 10-18.
- Huang, L., P. Wei, R. Zang, Z. Xu and P. Cen (2010). "High-throughput screening of high-yield colonies of *Rhizopus oryzae* for enhanced production of fumaric acid." *Annals of Microbiology* 60(2): 287-292.

- Ichikawa, S., T. Iino, S. Sato, T. Nakahara and S. Mukataka (2003). "Improvement of production rate and yield of fumaric acid from maleic acid by heat treatment of *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1." *Biochemical Engineering Journal* 13(1): 7-13.
- Ilica, R.-A., L. Kloetzer, A.-I. Galaction and D. Caşcaval (2018). "Fumaric acid: production and separation." *Biotechnology Letters*: 1-11.
- Jäger, G. and J. Büchs (2012). "Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals." *Biotechnology Journal* 7(9): 1122-1136.
- Ji, X. J., H. Huang, Z. K. Nie, L. Qu, Q. Xu and G. T. Tsao (2012). "Fuels and chemicals from hemicellulose sugars." *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 128: 199-224.
- Jin, H., H.-S. Kim, S.-K. Kim, M.-K. Shin, J.-H. Kim and J.-W. Lee (2002). "Production of heteropolysaccharide by *Beijerinckia indica* from agro-industrial byproducts." *Enzyme and microbial Technology* 30(6): 822-827.
- Jönsson, L. J., B. Alriksson and N.-O. Nilvebrant (2013). "Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification." *Biotechnology for Biofuels* 6(1): 1-10.
- Joshi, V. and D. Attri (2005). "Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products." *Pollution in Urban Industrial Environment*: 180-186.
- Kang, S. W., H. Lee, D. Kim, D. Lee, S. Kim, G.-T. Chun, J. Lee, S. W. Kim and C. Park (2010). "Strain development and medium optimization for fumaric acid production." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15(5): 761-769.
- Kautola, H. and Y.-Y. Linko (1989). "Fumaric acid production from xylose by immobilized *Rhizopus arrhizus* cells." *Applied Microbiology and Biotechnology* 31(5-6): 448-452.
- Kenealy, W., E. Zaady, J. C. du Preez, B. Stieglitz and I. Goldberg (1986). "Biochemical aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus*." *Applied environmental Microbiology* 52(1): 128-133.
- Kim, J. S., Y. Lee and T. H. Kim (2016). "A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology* 199: 42-48.
- Klotz, S. (2017). "Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure - Substitution von Hefeextrakt durch agrarische Rohstoffhydrolysate." *Doktorarbeit*, Technische Universität Braunschweig.
- Knill, C. and J. Kennedy (1998). "Cellulosic biomass-derived products." *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. Marcel Dekker, New York: 937-956.
- Kosakai, Y., Y. Soo Park and M. Okabe (1997). "Enhancement of L(+)-lactic acid production using mycelial flocs of *Rhizopus oryzae*." *Biotechnology and Bioengineering* 55(3): 461-470.
- Krautgartner, R., S. Lieberz, T. De Belder, M. Pinckaers and O. Bettini (2016). "EU-28 fresh deciduous fruit annual 2016." *USDA Foreign Agricultural Service*.
- Lee, S. Y., S. H. Hong, S. H. Lee and S. J. Park (2004). "Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis." *Macromolecular Bioscience* 4(3): 157-164.

- Li, X., J. Zhou, S. Ouyang, J. Ouyang and Q. Yong (2017). "Fumaric acid production from alkali-pretreated corncob by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation combined with separated hydrolysis and fermentation at high solids loading." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181(2): 573-583.
- Liao, W., Y. Liu, C. Frear and S. Chen (2007). "A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – *Rhizopus oryzae*." *Bioresource Technology* 98(18): 3415-3423.
- Ling, L. B. and T. K. Ng (1989). "Fermentation process for carboxylic acids." US Patent 4,877,731 (to E. I. Du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Del.).
- Liu, H., W. Wang, L. Deng, F. Wang and T. Tan (2015). "High production of fumaric acid from xylose by newly selected strain *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9." *Bioresource Technology* 186: 348-350.
- Liu, H., J. Ma, M. Wang, W. Wang, L. Deng, K. Nie, X. Yue, F. Wang and T. Tan (2016). "Food waste fermentation to fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* RH7-13." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 180(8): 1524-1533.
- Liu, H., H. Hu, Y. Jin, X. Yue, L. Deng, F. Wang and T. Tan (2017). "Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9." *Bioresource Technology* 233: 30-33.
- Liu, Y., C. Lv, Q. Xu, S. Li, H. Huang and P. Ouyang (2015a). "Enhanced acid tolerance of *Rhizopus oryzae* during fumaric acid production." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38(2): 323-328.
- Liu, Y., Q. Xu, C. Lv, C. Yan, S. Li, L. Jiang, H. Huang and P. Ouyang (2015b). "Study of metabolic profile of *Rhizopus oryzae* to enhance fumaric acid production under low pH condition." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 177(7): 1508-1519.
- Lohbeck, K., H. Haferkorn, W. Fuhrmann and N. Fedtke (2000). "Maleic and fumaric acids." *Ullmann's Encyclopedia of industrial Chemistry*.
- Loix, C., M. Huybrechts, J. Vangronsveld, M. Gielen, E. Keunen and A. Cuypers (2017). "Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants." *Frontiers in Plant Science* 8: 1867.
- Lubowitz, H. R. and R. E. G. La (1958). "Fumaric acid fermentation process." US Patent 2,861,922 (to National Distillers and Chemical Corporation).
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. Van Zyl and I. S. Pretorius (2002). "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3): 506-577.
- Magnuson, J. K. and L. L. Lasure (2004). "Organic acid production by filamentous fungi." *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*, Springer Verlag: 307-340.
- Magyar, M., L. da Costa Sousa, M. Jin, C. Sarks and V. Balan (2016). "Conversion of apple pomace waste to ethanol at industrial relevant conditions." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(16): 7349-7358.
- Martin-Dominguez, V., J. Estevez, F. Ojembarrena, V. Santos and M. Ladero (2018). "Fumaric acid production: a biorefinery perspective." *Fermentation* 4(2): 1-22.

- McGinn, S., K. Beauchemin, T. Coates and D. Colombatto (2004). "Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid." *Journal of Animal Science* 82(11): 3346-3356.
- McKendry, P. (2002). "Energy production from biomass (part 1): overview of biomass." *Bioresource Technology* 83(1): 37-46.
- Mecking, S. (2004). "Nature or petrochemistry? - biologically degradable materials." *Angewandte Chemie* 43(9): 1078-1085.
- Menon, V. and M. Rao (2012). "Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept." *Progress in Energy and Combustion Science* 38(4): 522-550.
- Metz, B. and N. Kossen (1977). "The growth of molds in the form of pellets - a literature review." *Biotechnology and Bioengineering* 19(6): 781-799.
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chemistry* 31 (3): 426-428.
- Moresi, M., E. Parente, M. Petruccioli and F. Federici (1991). "Optimization of fumaric acid production from potato flour by *Rhizopus arrhizus*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 36(1): 35-39.
- Munk, K., N. Requena and R. Fischer (2008). "Mikrobiologie." *Taschenlehrbuch Biologie*, Georg Thieme Verlag.
- "NRRL Culture Collection - *Rhizopus oryzae* NRRL 1526." retrieved from <https://nrrl.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda/mold/report.html?nrrlcodes=1526> (06.02.2019).
- Oh, K.-K., S.-W. Kim, Y.-S. Jeong and S.-I. Hong (2000). "Bioconversion of cellulose into ethanol by nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 89(1): 15-30.
- Olsson, L., H. Jørgensen, K. B. R. Krogh and C. F. A. Roca (2005). "Bioethanol production from lignocellulosic material. Polysaccharides." *Structural diversity and functional versatility*, Marcel Dekker Verlag.
- Paganini, C., A. Nogueira, N. C. Silva and G. Wosiacki (2005). "Utilization of apple pomace for ethanol production and food fiber obtainment." *Ciência e Agrotecnologia* 29(6): 1231-1238.
- Papadaki, A., N. Androutsopoulos, M. Patsalou, M. Koutinas, N. Kopsahelis, A. M. d. Castro, S. Papanikolaou and A. A. Koutinas (2017). "Biotechnological production of fumaric acid: the effect of morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582." *Fermentation* 3(33): 1-13.
- Papadaki, A., H. Papapostolou, M. Alexandri, N. Kopsahelis, S. Papanikolaou, A. M. de Castro, D. M. Freire and A. A. Koutinas (2018). "Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes." *Environmental Science and Pollution Research* 25(36): 35960-35970.
- Papagianni, M. (2004). "Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes." *Biotechnology Advances* 22(3): 189-259.
- Parmar, I. and H. P. V. Rupasinghe (2013). "Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: enzymatic hydrolysis and fermentation." *Bioresource Technology* 130: 613-620.

- Peleg, Y., E. Battat, M. C. Scrutton and I. Goldberg (1989). "Isoenzyme pattern and subcellular localisation of enzymes involved in fumaric acid accumulation by *Rhizopus oryzae*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 32(3): 334-339.
- Popa, V. I. and I. Spiridon (1998). "Hemicelluloses: structure and properties." *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, Marcel Dekker Verlag: 297-311.
- Rhodes, R. A., A. J. Moyer, M. L. Smith and S. E. Kelley (1959). "Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*." *Applied Microbiology* 7(2): 74-80.
- Rhodes, R. A., A. A. Lagoda, T. J. Misenheimer, M. L. Smith, R. F. Anderson and R. W. Jackson (1962). "Production of fumaric acid in 20-liter fermentors." *Applied Microbiology* 10(1): 9-15.
- "riha WeserGold - Untersuchung von Trester." (2015) *riha WeserGold Prüfbericht* (24.09.2015).
- Riscaldati, E., M. Moresi, F. Federici and M. Petruccioli (2000). "Direct ammonium fumarate production by *Rhizopus arrhizus* under phosphorous limitation." *Biotechnology Letters* 22(13): 1043-1047.
- Riscaldati, E., M. Moresi, F. Federici and M. Petruccioli (2002). "Ammonium fumarate production by free or immobilised *Rhizopus arrhizus* in bench- and laboratory-scale bioreactors." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77(9): 1013-1024.
- Roa Engel, C. A., A. J. J. Straathof, T. W. Zijlmans, W. M. van Gulik and L. A. M. van der Wielen (2008). "Fumaric acid production by fermentation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(3): 379-389.
- Roa Engel, C. A., W. M. van Gulik, L. Marang, L. A. M. van der Wielen and A. J. J. Straathof (2011). "Development of a low pH fermentation strategy for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*." *Enzyme and Microbial Technology* 48(1): 39-47.
- Romano, A. H., M. M. Bright and W. E. Scott (1967). "Mechanism of fumaric acid accumulation in *Rhizopus nigricans*." *Journal of Bacteriology* 93(2): 600-604.
- Sauer, M., D. Porro, D. Mattanovich and P. Branduardi (2008). "Microbial production of organic acids: expanding the markets." *Trends in Biotechnology* 26(2): 100-108.
- Schieber, A., P. Hilt, P. Streker, H. U. Endreß, C. Rentschler and R. Carle (2003). "A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4(1): 99-107.
- Schobinger, U. (2001). "Frucht-und Gemüsesäfte – Technologie, Chemie, Mikrobiologie, Analytik, Bedeutung, Recht." *Handbuch der Lebensmitteltechnologie*, Eugen Ulmer Verlag.
- Sette, M., R. Wechselberger and C. Crestini (2011). "Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR." *Chemistry - A European Journal* 17(34): 9529-9535.
- Shambaugh, G. (1977). "Urea biosynthesis I. the urea cycle and relationships to the citric acid cycle." *The American Journal of Clinical Nutrition* 30(12): 2083-2087.
- Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton and D. Crocker (2008). "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass." *NREL Technical Report TP-510-42618*: 1-15.

- Song, P., S. Li, Y. Ding, Q. Xu and H. Huang (2011). "Expression and characterization of fumarase (FUMR) from *Rhizopus oryzae*." *Fungal Biology* 115(1): 49-53.
- Sudha, M. L., V. Baskaran and K. Leelavathi (2007). "Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making." *Food Chemistry* 104(2): 686-692.
- Sun, J., X. Hu, G. Zhao, J. Wu, Z. Wang, F. Chen and X. Liao (2007). "Characteristics of thin-layer infrared drying of apple pomace with and without hot air pre-drying." *Food Science and Technology* 13(2): 91-97.
- Sun, Y. and J. Cheng (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." *Bioresource Technology* 83(1): 1-11.
- Taherzadeh, M. and K. Karimi (2008). "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review." *International Journal of Molecular Sciences* 9(9): 1621-1651.
- Tenenbaum, D. J. (2008). "Food vs. fuel: diversion of crops could cause more hunger." *National Institute of Environmental Health Sciences*: 254-257.
- Tsao, G. T., N. J. Cao, J. Du, and C. S. Gong (1999). "Production of multifunctional organic acids from renewable resources." *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, Springer Verlag: 243-280.
- Vendruscolo, F., P. M. Albuquerque, F. Streit, E. Esposito and J. L. Ninow (2008). "Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications." *Critical Reviews in Biotechnology* 28(1): 1-12.
- Wadhwa, M. and M. Bakshi (2013). "Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products." *Rap Publication* 4: 1-56.
- Waksman, S. A. (1943). "Process for the production of fumaric acid." US Patent 2,326,986 (to Merck & Co., Inc. and Pfizer & Co., Inc.).
- Wang, G., D. Huang, H. Qi, J. Wen, X. Jia and Y. Chen (2013). "Rational medium optimization based on comparative metabolic profiling analysis to improve fumaric acid production." *Bioresource Technology* 137: 1-8.
- Wang, H. and R. Thomas (1989). "Direct use of apple pomace in bakery products." *Journal of Food Science* 54(3): 618-620.
- Weißert, R. (2014). "Multiple Sklerose-Risiken und Nutzen der neuen antiinflammatorischen Substanzen." *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 16(3): 95-101.
- Werpy, T. and G. Petersen (2004). "Top value added chemicals from biomass: volume I - results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas." *National Renewable Energy Laboratory*.
- Willats, W. G., L. McCartney, W. Mackie and J. P. Knox (2001). "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis." *Plant Molecular Biology* 47(1-2): 9-27.

- Wooley, R., M. Ruth, D. Glassner and J. Sheehan (1999). "Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development." *Biotechnology Progress* 15(5): 794-803.
- Wu, X., Q. Liu, Y. Deng, X. Chen, Z. Zheng, S. Jiang and X. Li (2018). "Production of fumaric acid by bioconversion of corncob hydrolytes using an improved *Rhizopus oryzae* strain." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 184(2): 553-569.
- Wyman, C. E., S. R. Decker, M. E. Himmel, J. W. Brady, C. E. Skopec and L. Viikari (2005). "Hydrolysis of cellulose and hemicellulose." *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* 1: 1023-1062.
- Xiao, Z., X. Zhang, D. J. Gregg and J. N. Saddler (2004). "Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates." *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Springer Verlag.
- Xu, Q., S. Li, Y. Fu, C. Tai and H. Huang (2010). "Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production." *Bioresource Technology* 101(15): 6262-6264.
- Xu, Q., S. Li, H. Huang and J. Wen (2012). "Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation." *Biotechnology Advances* 30(6): 1685-1696.
- Xu, Q., Y. Liu, S. Li, L. Jiang, H. Huang and J. Wen (2016). "Transcriptome analysis of *Rhizopus oryzae* in response to xylose during fumaric acid production." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39(8): 1267-1280.
- Xu, Q., S. He, L. Jiang, S. Li, J. Wen, R. Guan and H. Huang (2017). "Extractive fermentation for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*." *Separation Science and Technology* 52(9): 1512-1520.
- Yang, S., K. Zhang, B. Zhang and H. Huang (2011). "Biobased chemicals - fumaric acid." *Comprehensive Biotechnology*: 163-177.
- Yeh, C.-J. G., B.-L. Hsi and W. P. Faulk (1981). "Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. use with cellular identification and viability studies." *Journal of Immunological Methods* 43(3): 269-275.
- Yogev, O., A. Naamati and O. Pines (2011). "Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions." *The FEBS journal* 278(22): 4230-4242.
- Yu, S., D. Huang, J. Wen, S. Li, Y. Chen and X. Jia (2012). "Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by femtosecond laser irradiation." *Bioresource Technology* 114: 610-615.
- Yu, X., F. R. Van De Voort, Z. Li and T. Yue (2007). "Proximate composition of the apple seed and characterization of its oil." *International Journal of Food Engineering* 3(5).
- Zeller, V., D. Thrän, M. Zeymer, B. Bürzle, P. Adler, J. Ponitka, J. Postel, F. Müller-Langer, S. Rönsch and A. Gröngroft (2012). "Basisinformationen für eine nachhaltige Nutzung von landwirtschaftlichen Reststoffen zur Bioenergiebereitstellung." *DBFZ Report* 13.

- Zhang, K., B. Zhang and S. T. Yang (2013). "Production of citric, itaconic, fumaric and malic acids in filamentous fungal fermentations." *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for sustainable Production of Fuels, Chemicals and Polymers*, John Wiley & Sons Verlag: 375-397.
- Zhang, K., C. Yu and S.-T. Yang (2015). "Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*." *Process Biochemistry* 50(2): 173-179.
- Zhang, Z., B. Jin and J. Kelly (2007). "Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(2): 229-236.
- Zhou, Y., J. Du and G. T. Tsao (2000). "Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84(1): 779-789.
- Zhou, Y., J. Du and G. T. Tsao (2002). "Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25(3): 179-181.
- Zhou, Z., G. Du, Z. Hua, J. Zhou and J. Chen (2011). "Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation." *Bioresource Technology* 102(20): 9345-9349.

Abkürzungsverzeichnis und Formelzeichen

Liste der verwendeten Abkürzungen:

Abkürzung	Bezeichnung
AT	Apfeltrester
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
FA	Fumarsäure
FBRM	Fokussierte Laserrückstreuung englisch - focused beam reflectance measurement
FPU	Filter Paper Unit
GTP	Guanosintriphosphat
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie englisch - high performance anion exchange chromatography
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie englisch - high performance liquid chromatography
IC	Ionenchromatographie
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma englisch - inductively coupled plasma
OES	Optische Emissionsspektroskopie englisch - optical emission spectrometry
PAD	Gepulste amperometrische Detektion englisch - pulsed amperometric detection
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RI	Brechungsindex englisch - refractive index
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SHF	Separate Hydrolyse und Fermentation englisch - separate hydrolysis and fermentation
SK	Schüttelkolben
SSF	Simultane Verzuckerung und Fermentation englisch - simultaneous saccharification and fermentation
STR	Rührreaktor englisch - stirred tank reactor
UV	Ultraviolett

Liste der verwendeten Formelzeichen:

Formelzeichen	Einheit	Bedeutung
0	[-]	Startpunkt
A	[mm ²]	Fläche
c	[g/L]	Konzentration
h	[mm]	Höhe
\bar{n}	[-]	Mittelwert
P	[-]	Produkt
Pr	[g/(L·h)]	Produktivität
S	[-]	Substrat
t	[h]	Dauer
$Y_{p/s}$	[g/g]	Ausbeute

Abbildungsverzeichnis

2.1	Strukturformel von Fumarsäure.	3
2.2	Produktion von Fumarsäure in <i>Rhizopus</i> sp. mittels oxidativem Citratzyklus und reduktiver Carboxylierung.	8
2.3	Schematische Darstellung der Fumarsäureproduktion mit <i>Rhizopus</i> sp.	10
2.4	Schematischer Aufbau von lignocellulosehaltiger Biomasse, bestehend aus Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin.	17
2.5	Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose zu Glucose mittels Endo- und Exoglucanase sowie β -Glucosidase.	21
2.6	Schematische Darstellung der Prozessvarianten bei Biokonversionen.	22
4.1	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Herstellung von Sporensuspension mit Medium A bei 34 °C über 7 d.	49
4.2	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 nach Ling und Ng (1989) mit 10 % (v/v) Vorkultur und Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 1 von Roth.	49
4.3	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung nach Ling und Ng (1989).	50
4.4	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und Medium C (0,1 g/L Hefeextrakt) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 1 von Roth); Vorkultur mit Medium B (0,1 g/L Hefeextrakt) in 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen bei 32 °C, 200 rpm, über 18 h.	52
4.5	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit 0,1 g/L Hefeextrakt.	52
4.6	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Vorkultur mit Medium B (ohne Komplexmedienbestandteile) in 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen bei 32 °C und 200 rpm, nach 18 h.	53
4.7	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 1 von Roth).	54
4.8	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 1 von Roth)	54

Abbildungsverzeichnis

4.9	Mikroskopische Aufnahmen von Calciumcarbonat (Typ 1 von Roth, Typ 2 von VWR).	55
4.10	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR).	56
4.11	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR)	56
4.12	Einfluss von Weinsäure auf die Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR).	57
4.13	Einfluss der initialen Sporenkonzentration auf die Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR)	58
4.14	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation (neue Charge an Sporensuspension) und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR).	59
4.15	Einfluss der Konzentration von Spurenelementen auf die Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) nach 7 d.	61
4.16	Einfluss der Konzentration von KH ₂ PO ₄ auf die Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) nach 7 d.	63
4.17	Einfluss der Konzentration von (NH ₄) ₂ SO ₄ auf die Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) nach 7 d.	64
4.18	Mikroskopische Aufnahmen von Calciumcarbonat (Typ 1 von Roth, Typ 1 von Roth - mechanisch zerkleinert, Typ 2 von VWR).	65
4.19	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C und 200 rpm; A - Kultivierung mit 50 g/L CaCO ₃ (Typ 1 von Roth), B - Kultivierung mit 50 g/L mechanisch zerkleinertem CaCO ₃ (Typ 1 von Roth).	66
4.20	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und Medium C (ohne Komplexmedienbestandteile und Weinsäure) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR); A - Kultivierung ohne weitere Zugabe von CaCO ₃ , B - Kultivierung mit Zugabe von 10 g/L CaCO ₃ nach 3, 4 und 5 d.	67
4.21	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 10 g/L CaCO ₃ nach 3, 4 und 5 d.	69

Abbildungsverzeichnis

4.22	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C nach 3 d.	72
4.23	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C nach 7 d; A - Mycelium ohne Fluoreszenzfärbung, B - Mycelium mit Fluoreszenzfärbung (Propidiumiodid).	73
4.24	Einfluss der initialen Glucosekonzentration auf die Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO ₃	75
4.25	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2 und 4 d.	77
4.26	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit Vorkultur und optimiertem Medium C nach 3 d.	78
4.27	Verlauf der Konzentrationen von Biotrockenmasse, Ammonium und Phosphat bei der Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2 und 4 d.	79
4.28	Löslichkeit von Fumarsäure bei der Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2 und 4 d.	81
4.29	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR).	82
4.30	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2 d.	83
4.31	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C (130 g/L initiale Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR); Zugabe von 40 g/L Glucose nach 2, 5 und 9 d; Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2, 4, 6, 8, 10 und 13 d.	84
4.32	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C (200 g/L initiale Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR); Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2, 4, 6 und 8 d.	86
4.33	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit Vorkultur und optimiertem Medium C (200 g/L initiale Glucose) nach 8 d.	87
4.34	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C (130 g/L initiale Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR); Zugabe von 80 g/L Glucose nach 3 und 6 d; Zugabe von 1,2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ nach 3 und 6 d; Zugabe von 0,6 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ nach 8 d; Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2, 4, 5, 6, 8 und 10 d.	88
4.35	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit Vorkultur, optimiertem Medium C (130 g/L initiale Glucose) und Zugabe von Glucose und Ammonium.	89

4.36	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C (200 g/L initiale Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR); Zugabe von 80 g/L Glucose nach 7 und 9 d; Zugabe von 1,2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ nach 7 d; Zugabe von 0,6 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ nach 10, 12 und 14 d; Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13 und 15 d.	90
4.37	Kristallstruktur von Fumarsäure bei der Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit Vorkultur, optimiertem Medium C (200 g/L initiale Glucose) und Zugabe von Glucose und Ammonium.	91
4.38	Reaktorkultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C bei 34 °C, 400 rpm, 6,0 L/h (Luft) und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) ohne weitere Zugabe von CaCO ₃	93
4.39	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Reaktorkultivierung mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C.	93
4.40	Reaktorkultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C bei 34 °C, 400 rpm, 6,0 L/h (Luft) und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) ohne weitere Zugabe von CaCO ₃ ; 1 L-Reaktoren ohne pH- und DO-Elektroden, mit täglichem Wechsel der Begasungsfritte.	95
4.41	Reaktorkultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C bei 34 °C, 400 rpm, 6,0 L/h (Luft) und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR), mit Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 1 d; 1 L-Reaktoren ohne pH- und DO-Elektroden.	97
4.42	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Reaktorkultivierung mit Vorkultur und optimiertem Medium C.	98
4.43	Verlauf der Konzentrationen von Biotrockenmasse, Ammonium und Phosphat bei der Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit zweistufiger Vorkultur und optimiertem Medium C (ohne Ammonium) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2 und 4 d.	100
4.44	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit zweistufiger Vorkultur und optimiertem Medium C (ohne Ammonium) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit Zugabe von 20 g/L CaCO ₃ nach 2 und 4 d.	101
4.45	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C (mit 130 g/L Fructose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR); Aufnahme der Morphologie nach 7 d.	107
4.46	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR); A - Kultivierung auf Basis von Fructose, B - Kultivierung auf Basis von Xylose.	109
4.47	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit Vorkultur und optimiertem Medium C nach 3 d; A - Aufnahme der Kultivierung mit Fructose, B - Aufnahme der Kultivierung mit Xylose.	109

Abbildungsverzeichnis

4.48	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit 10 % (v/v) Vorkultur und optimiertem Medium C in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR); A - Kultivierung auf Basis von synthetischem Apfeltrester-Medium, B - Kultivierung auf Basis von synthetischem Weizenkaff-Medium.	111
4.49	Einfluss des verwendeten Zuckertyps auf die Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit Vorkultur und optimiertem Medium C (130 g/L Gesamtzucker) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO ₃	113
4.50	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und optimiertem Medium C (ohne Ammonium) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO ₃ ; A - Kultivierung auf Basis von Fructose, B - Kultivierung auf Basis von synthetischem Apfeltrester-Medium.	114
4.51	Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit separater Biomasseproduktion und optimiertem Medium C (ohne Ammonium) nach 6 d; A - Aufnahme der Kultivierung mit Fructose, B - Aufnahme der Kultivierung mit synthetischem Apfeltrester-Medium.	115
4.52	Einfluss des verwendeten Zuckertyps auf die Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und optimiertem Medium C (ohne Ammonium, 100 g/L Gesamtzucker) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR) mit zusätzlicher Zugabe von CaCO ₃	116
4.53	Apfeltrester von riha WeserGold.	117
4.54	Fraktionierung von Apfeltrester.	119
4.55	Anteile und Zusammensetzung der Zucker in Apfeltrester.	120
4.56	Simultane Verzuckerung von Apfeltrester mit 1,5 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x und Fermentation mit <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und einer Regulierung des pH-Wertes mittels 50 mM Citrat-Puffer.	123
4.57	Simultane Verzuckerung von Apfeltrester mit 1,5 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x und Fermentation mit <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 und optimierten Medium C (mit Glucose) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und einer Regulierung des pH-Wertes mittels 50 g/L CaCO ₃	124
4.58	Zusätzliches Auspressen von 500 g Apfeltrester mittels HP-2 H bei einem Pressdruck von 20 bzw. 100 bar.	127
4.59	Zusätzliches Auspressen von Apfeltrester mittels HP-2 H bei einem Pressdruck von 20 bar über 20 min; A - Zuckerzusammensetzung des erhaltenen Presssafts, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.	128
4.60	Bilanzierung des zusätzlichen Auspressens von Apfeltrester mittels HP-2 H bei einem Pressdruck von 20 bar über 20 min.	129
4.61	Zuckerkonzentration der Extrakte bei der dreistufige Extraktion von Apfeltrester mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) und anschließender Separierung mittels HP-2 H Presse (20 bar).	130

Abbildungsverzeichnis

4.62	Dreistufige Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) von Apfeltrester und anschließender Separierung mittels HP-2 H Presse (20 bar); A - Zuckerzusammensetzung des aufkonzentrierten und vereinigten Konzentrats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.	131
4.63	Bilanzierung der mehrstufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) von Apfeltrester.	132
4.64	Einfluss der Glucose- und Fructosekonzentration auf die Cellulaseaktivität von Biogazyme 2x, bei 50 °C und pH 4,8; A - Inhibierung durch Glucose, B - Inhibierung durch Fructose.	133
4.65	Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm.	135
4.66	Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 500 mM Citrat-Puffer und 6,0 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x; A - Verlauf der Konzentration an Gesamtzuckern, B - Verlauf der Glucosekonzentration, C - Verlauf der Fructosekonzentration.	136
4.67	Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 500 mM Citrat-Puffer und 6,0 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x, anschließende Separierung mittel Zentrifugation bei 8.500 rpm über 20 min; A - Zuckerzusammensetzung des abgetrennten Hydrolysats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.	137
4.68	Bilanzierung der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester mit 6,0 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x und Feed-Strategie.	138
4.69	Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 50 mM Citrat-Puffer und 1,8 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x.	139
4.70	Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 50 mM Citrat-Puffer und 1,8 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x, anschließende Separierung mittel Zentrifugation bei 8.500 rpm über 20 min; A - Zuckerzusammensetzung des abgetrennten Hydrolysats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.	140
4.71	Bilanzierung der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester mit 1,8 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x und Feed-Strategie.	140
4.72	Zuckerkonzentration des Presssafts und der beiden Extrakte beim zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester mittels HP-2 H (20 bar, 20 min) gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) und jeweiliger Separierung mittels HP-2 H Presse (20 bar).	143
4.73	Zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester mittels HP-2 H (20 bar, 20 min) gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1); A - Zuckerzusammensetzung des aufkonzentrierten und vereinigten Konzentrats, B - Tabellarische Übersicht der Gesamtausbeute und des Nutzungsgrads der in Apfeltrester enthaltenen Zucker.	143
4.74	Bilanzierung des zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser.	144

Abbildungsverzeichnis

4.75	Enzymatische Hydrolyse von Apfeltrester-Restfeststoff mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm, insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 50 mM Citrat-Puffer und 1,8 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x.	145
4.76	Zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester mittels HP-2 H (20 bar, 20 min) gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) und enzymatische Hydrolyse des Apfeltrester-Restfeststoff mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie bei 50 °C und 50 rpm (insgesamt 20 % (w/w) Feststoffanteil in 50 mM Citrat-Puffer und 1,8 FPU/g _{BTM} Biogazyme 2x.	146
4.77	Bilanzierung des zusätzlichen Auspressen von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser und enzymatische Hydrolyse des Apfeltrester-Restfeststoff mit Biogazyme 2x und zweistufiger Feed-Strategie.	147
4.78	A - Aufnahme der zuckerhaltigen Flüssigkeit (mittels zusätzlichem Auspressen von Apfeltrester gefolgt von einer zweistufigen Extraktion mit Wasser hergestellt), B - Zuckerzusammensetzung der zuckerhaltigen Flüssigkeit.	149
4.79	Zeitlicher Verlauf der Fällung von Trübstoffen bei der zuckerhaltigen Flüssigkeit mit 1 % (w/w) Calciumcarbonat, Durchmischung des Reaktionsansatzes mittels Magnetrührer für 5 min.	150
4.80	A - Aufnahme der zuckerhaltigen Flüssigkeit nach der Fällung von Trübstoffen mit 1 % (w/w) Calciumcarbonat, B - Getrockneter Restfeststoff nach der Separation mittels Zentrifugation (8.500 rpm für 10 min).	151
4.81	Aufnahme des aufgereinigten Apfeltrester-Safts nach der Fällung von Trübstoffen mit Calciumcarbonat und der zweimaligen Aufreinigung mittels Kationentauscher-Säule (Dowex 50WX8).	151
4.82	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit Vorkultur und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (inkl. Spurenelemente, 0,3 g/L KH ₂ PO ₄ und 1,2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR).	153
4.83	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit Vorkultur und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (inkl. Spurenelemente, 0,3 g/L KH ₂ PO ₄ und ohne (NH ₄) ₂ SO ₄ -Zugabe) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR).	155
4.84	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (90 g/L Zucker, inkl. Spurenelemente, 0,3 g/L KH ₂ PO ₄ und ohne (NH ₄) ₂ SO ₄ -Zugabe) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR).	156
4.85	Morphologie bei der Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (90 g/L Zucker).	158
4.86	Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (150 g/L Zucker, inkl. Spurenelemente, 0,3 g/L KH ₂ PO ₄ und ohne (NH ₄) ₂ SO ₄ -Zugabe) in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei 34 °C, 200 rpm und 50 g/L CaCO ₃ (Typ 2 von VWR).	159
4.87	Morphologie bei der Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit separater Biomasseproduktion und aufgereinigtem Apfeltrester-Saft (150 g/L Zucker).	160
4.88	Schematische Darstellung des entwickelten Herstellungsprozesses von Fumarsäure auf Basis von Apfeltrester.	163

Tabellenverzeichnis

2.1	Chemische und physikalische Eigenschaften von Fumarsäure.	4
2.2	Überblick über die fermentative Produktion von Fumarsäure mittels <i>Rhizopus</i> sp. auf Basis von Glucose.	7
2.3	Überblick über die fermentative Produktion von Fumarsäure mittels <i>Rhizopus</i> sp. auf Basis alternativer Kohlenstoffquellen.	13
3.1	Stammlösungen zur Herstellung der Kultivierungsmedien.	24
3.2	Zusammensetzung von Medium A nach Ling und Ng (1989).	25
3.3	Zusammensetzung von Medium B nach Ling und Ng (1989).	26
3.4	Zusammensetzung von Medium C nach Ling und Ng (1989).	26
3.5	Zusammensetzung des optimierten Medium C.	27
3.6	Technische Daten des DasGip-Reaktorsystems.	30
3.7	Temperaturprogramm beim thermischen Aufschluss nach Kjeldahl.	33
3.8	Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse von Apfeltrester.	36
3.9	Inventur der benötigten Materialien und Chemikalien zur Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfeltrester.	37
3.10	Inventur der benötigten Prozessvorgänge zur Herstellung einer zuckerhaltigen Flüssigkeit auf Basis von Apfeltrester.	37
3.11	HPLC-System zur Analyse von Glucose, Fumarsäure und Nebenprodukten.	40
3.12	HPAEC-PAD-System zur Analyse von verschiedenen Sacchariden.	41
3.13	Zeitabhängige Zusammensetzung der Eluenten für das HPAEC-PAD-System zur Analyse von verschiedenen Sacchariden.	41
3.14	IC-Systemkomponenten und Methoden zur Analyse von Kationen und Anionen.	42
3.15	Übersicht der mittels ICP-OES ermittelten Elemente mit zugehöriger Wellenlänge und Messmodus.	43
3.16	Ansätze zur Bestimmung der Cellulaseaktivität von Biogazyme 2x.	45

Tabellenverzeichnis

3.17	Zusammensetzung der DNS-Reagenz nach Ghose (1987).....	46
4.1	Anteil der Spurenelemente in CaCO_3 (Typ 2 von VWR) und die theoretische Konzentration der Spurenelemente in Medium C, ohne und mit Zugabe von 50 g/L CaCO_3	62
4.2	Mikroskopische Aufnahmen der Morphologie von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 bei der Kultivierung mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C.	71
4.3	Variation der initialen Glucosekonzentration bei der Kultivierung von <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 mit direkter Sporeninokulation und optimiertem Medium C.	74
4.4	Vergleich der Kultivierungsergebnisse zur Produktion von Fumarsäure auf Basis von Glucose mit <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526.	104
4.5	Anteilige Zuckerzusammensetzung der Modellsubstanzen Apfeltrester und Weizenkaff.	110
4.6	Charakteristische Eigenschaften von Apfeltrester im Vergleich zur Analyse von riha WeserGold (2015).	118
4.7	Verschiedene Bestandteile von Apfeltrester, mittels händischer Fraktionierung und Trocknung bei 105 °C.	119
4.8	Übersicht des Prozessaufwands zur Herstellung von 1 kg _{Zucker} auf Grundlage der mehrstufigen Extraktion mit Wasser (Extraktionsverhältnis 2/1) von Apfeltrester. ...	132
4.9	Vergleich der Kultivierungsergebnisse auf Basis unterschiedlicher Zuckerquellen, mit <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526 und separater Biomasseproduktion in Schüttelkolben.	161

A.1 Chemikalienliste

Tabelle A.1: Liste der verwendeten Chemikalien und Standards.

Chemikalie	Reinheit	Liferant
Agar-Agar	für die Mikrobiologie	Merck
Äpfelsäure	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Bernsteinsäure	zur Analyse	Merck
Biogazyme 2x	Pulver, <i>T. reesei</i>	ASA Spezialenzyme
Borsäure	≥ 99 %	Carl Roth
3,5-Dinitrosalicylsäure	-	Sigma Aldrich
Ethanol	≥ 99 %	Carl Roth
Filterpapier	Whatman No. 1	Sigma Aldrich
Fumarsäure	zur Analyse	Alfa Aesar
Glycerin, wasserfrei	≥ 98 %	Carl Roth
Harnstoff	≥ 99 %	Carl Roth
Hefeextrakt	für die Mikrobiologie	Merck
Kationentaucherharz	Dowex 50WX8 (50-100 mesh)	Sigma Aldrich
Maisquellwasser	-	Sigma Aldrich
Methylsulfonsäure	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Natriumacetat, wasserfrei	zur Analyse	Thermo Fisher
Natriumcitrat	-	Sigma Aldrich
Na-K-Tartarat	zur Analyse	Merck
Na-Metabisulfit	≥ 97 %	VWR
NaOH	zur Analyse	Merck
NaOH (50 - 52 %)	zur Analyse	Thermo Fischer
Propidiumiodid (0,5 mg/mL)	in Phosphat-Puffer	Sigma Aldrich
Salpersäure (65 %)	Supra	Carl Roth
Salzsäure (37 %)	rauchend	Merck
Schwefelsäure (0,5 M)	Fixanal	Fluka
Schwefelsäure (72 %)	zur Analyse	AppliChem
Schwefelsäure (96 %)	zur Analyse	Carl Roth

Chemikalie	Reinheit	Lieferant
Trypton/Pepton	aus Casein	Carl Roth
Wasserstoffperoxid (30 %)	Suprapur	Carl Roth
Weinsäure x H ₂ O	≥ 98 %	Fluka
Salze		
CaCO ₃ (Typ 1)	gefällt, ≥ 99 %	Roth
CaCO ₃ (Typ 2)	gefällt, ≥ 99 %	VWR
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	zur Analyse	Merck
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	zur Analyse	Merck
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	≥ 99 %	Merck
KCl	≥ 99 %	Merck
KH ₂ PO ₄	zur Analyse	Merck
NaCl	zur Analyse	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₄	≥ 99 %	Sigma Aldrich
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	≥ 99 %	Merck
MnSO ₄ x H ₂ O	zur Analyse	Carl Roth
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	≥ 98 %	Merck
Zucker		
Arabinose	≥ 99 %	Carl Roth
Fructose	≥ 99 %	Merck
Galactose	high purity grade	Amresco
Glucose x H ₂ O	für die Mikrobiologie	Carl Roth
Lactose x H ₂ O	-	Fluka
Mannose	≥ 99 %	Alfa Aesar
Rhamnose x H ₂ O	≥ 99 %	Alfa Aesar
Saccharose	für die Mikrobiologie	Merck
Xylose	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Standards		
Anionen-Multielement-Standard, 7 Anionen	in Wasser	Carl Roth
Kationen-Multielement-Standard, 6 Kationen	in 0,1 % HNO ₃	Carl Roth
ICP-Multielement-Standard, 28 Elemente	Rotistar 100 mg/L in 5 % HNO ₃	Carl Roth

A.2 Geräteliste

Tabelle A.2: Liste der verwendeten Geräte, die zuvor nicht erwähnt wurden.

Gerät	Typ	Hersteller
Analysewaage	Entris 224i-1S	Satorius AG, Göttingen
Autoklav	DX-23	SysTec GmbH, Linden
Autoklav	VX-40	SysTec GmbH, Linden
pO ₂ -Elektrode	InPro 6000 Series	Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA
Kamera	EOS 760D	Canon, Tokio, Japan
Laborwaage	EW 6200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Magnetrührer mit Heizplatte	RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
pH-Elektrode	InPro 405-DPAS-SC-K8S/225	Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA
	InLab Micro	Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA
pH-Meter	pH315i	WTW, Weilheim
Reinstwasser-Aufbereitungssystem	MilliQ plus 185	Merck KGaA, Darmstadt
Schüttelinkubator	HT Minitron (50 mm Auslenkung)	Infors Ag, Bottmingen, Schweiz
Sterilwerkbank	Hera Safe HS-12	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thoma-Zählkammer	(0,0025 mm ² x 0,02 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön
Trockenschrank	Modell 400	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Vortexmischer	Genius 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge	Heraeus Pico 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Sunnyvale, USA
	Biofuge Stratos	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
	Sorvall Evolution RC	Thermo Fisher Scientific Inc., Sunnyvale, USA

A.3 Partikelgrößenanalyse von Calciumcarbonat

Tabelle A.3: Durchschnittliche Partikelgröße von verschiedenen Typen an Calciumcarbonat; Analytische Bestimmung mittels FBRM durch die Universität Complutense Madrid (Miguel Ladero Galán, Associate Professor Chemical and Materials Engineering Dpt.)

Calciumcarbonat		Partikelgröße [μm]
Typ 1 (Roth)	- nicht mechanisch zerkleinert	57,8
Typ 1 (Roth)	- mechanisch zerkleinert	21,1
Typ 2 (VWR)	- nicht mechanisch zerkleinert	20,3

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ulf Prüße für die Überlassung des interessanten Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und für die Betreuung. Vor allem anregende Diskussionen, seine Ratschläge und seine Offenheit gegenüber neuen Ideen haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Anett Schallmey für die Übernahme des Koreferates und Herrn Prof. Dr. Udo Rau für die Übernahme des Vorsitzes in der Prüfungskommission.

Frau Dr. Anja Kuenz möchte ich für die enge, intensive und effektive Zusammenarbeit, ihr immer offenes Ohr sowie viele Diskussionen und Anregungen danken.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Thünen-Instituts für Agrartechnologie für die gute Zusammenarbeit, das herzliche Arbeitsklima und die vielen kleinen Hilfestellungen im Alltag. Ich möchte mich im Einzelnen bei Frank Brandes, Sarah Bromann, Katharina Goy, Victoria Hancock, Martina Heine, Marina Heuer, Heike Horn, Dr. Wibke Hußmann, Dennis Jäger, Dr. Malee Kallbach, Dr. Susan Krull, Doris Steinkraus, Evgenia Tryastsina und Dr. Thomas Willke bedanken.

Insbesondere danke ich Frau Ute-Christina Mertens für die tatkräftige Mithilfe im Labor und für die Unterstützung in guten sowie weniger guten Phasen dieser Promotion.

Ich danke meinen Studenten und Praktikanten, die ich während meiner Promotionszeit betreuen durfte, für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Verbundprojektes FAPA und der Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V. für die finanzielle Unterstützung des Projekts. Insbesondere danke ich Miguel Ladero Galán für die FBRM-Messungen zur Bestimmung der Partikelgröße von Calciumcarbonat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Friederike für die liebevolle Unterstützung, Motivation und Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

